

Projectnr.: 71.414.10

Ontwikkeling en implementatie van een geïntegreerde onderzoeksanpak voor de detectie van groeibevorderaars en hun metabolieten in agrarische producten.

Projectleider: R. Schilt

Rapport 99.001

december 1999

## **EFFECTEN VAN ORALE TOEDIENING VAN CLENBUTEROL AAN MANNELIJKE RATTEN: EEN PILOTSTUDIE**

M.J. Groot, J.S. Ossenkoppele

Afdeling: Veiligheid gezondheid en Voeding

DLO-Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwproducten (RIKILT-DLO)  
Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen  
Postbus 230, 6700 AE Wageningen  
Telefoon 0317-475400  
Telefax 0317-417717

Copyright 1999, DLO-Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT-DLO).  
Overname van de inhoud is toegestaan mits met duidelijke bronvermelding.

## VERZENDLIJST

### INTERN:

directeur

auteur(s)

programmaleiders (4x)

in- en externe communicatie (2x)

bibliotheek (3x)

### EXTERN:

CKP

DLO

VVM

Inspectie Gezondheidsbescherming, Waren en Veterinaire Zaken

RIVM

ID-DLO

## ABSTRACT

Effecten van orale toediening van clenbuterol aan mannelijke ratten: een pilotstudie

Effects of oral administration of clenbuterol to male rats: pilot-study (in Dutch)

Report 99.001

M.J. Groot, J.S. Ossenkoppele

3 tables, 11 photo's, 18 references

During 28 days male rats were fed feed containing clenbuterol. Group A received feed without clenbuterol (2 animals), group B received feed with 1 mcg clenbuterol per kg (2 animals), group C received feed with 0.5 mg clenbuterol per kg (2 animals) and group D received feed containing 1 mg clenbuterol per kg (2 animals).

There was no difference in feed intake between the groups, whereas the animals of the groups C and D reached a higher bodyweight. The weights of the muscles were also increased in the clenbuterol fed animals of groups C and D and the weight of the liver was reduced in these groups. Histological examination revealed mild toxic hepatitis in the clenbuterol fed animals, the group D animals showing the most evident alterations. The clenbuterol fed animals showed some necrotic fibers in the heart muscle. The adrenal and thymus showed atrophic changes in the clenbuterol fed animals and there were small changes observed in the testes and prostate.

It is concluded that male rats fed clenbuterol at low concentrations (0.5-1 mg clenbuterol per kg food) showed improved growth rate and feed conversion, whereas histopathological changes occurred in liver, heart, adrenal, thymus, prostate and testis. Similar observations have previously been reported for clenbuterol fed cattle. These studies of histopathological effects of clenbuterol indicate that rats may be used as a model for cattle with respect to clenbuterol.

Keywords: clenbuterol, rats, histology, organ weights

## VOORWOORD

Hierbij willen wij de medewerkers van het Centrum Kleine Proefdieren bedanken voor hun inzet en bijdrage voor het slagen van dit dierexperiment.

<b>INHOUD</b>	<b>blz.</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>1</b>
<b>VOORWOORD</b>	<b>2</b>
<b>SAMENVATTING</b>	<b>5</b>
<b>1 INLEIDING</b>	<b>7</b>
<b>2 MATERIAAL EN METHODEN</b>	<b>8</b>
2.1 Proefdieren	8
2.2 Proefschema	8
2.3 Bepalingen	8
<b>3 RESULTATEN</b>	<b>9</b>
3.1 Zoötechniek	9
3.2 Histopathologie	9
<b>4 DISCUSSIE</b>	<b>10</b>
<b>5 CONCLUSIES</b>	<b>11</b>
<b>LITERATUUR</b>	

## SAMENVATTING

Aan mannelijke ratten is gedurende 28 dagen clenbuterolhoudend voer verstrekt in 3 doseringen. Groep A kreeg voer zonder clenbuterol (2 dieren), groep B kreeg 1 mcg clenbuterol per kg voer (2 dieren), groep C kreeg 0.5 mg clenbuterol per kg voer (2 dieren) en groep D kreeg 1 mg clenbuterol per kg voer (2 dieren).

De voeropname verschilde niet tussen de groepen, maar de dieren van groep C en D hadden een wat hoger eindgewicht. De spiergewichten waren ook hoger bij de met clenbuterol gevoerde dieren van groep C en D, terwijl bij deze groepen de levergewichten lager waren.

Bij histologisch onderzoek bleek dat de met clenbuterol gevoerde dieren geringe leverafwijkingen vertoonden (toxische hepatitis), welke het meest uitgesproken waren in groep D. Ook vertoonden de dieren uit de groepen B, C en D, necrotische vezels in de hartspeer. De bijnier en thymus vertoonden atrofische verschijnselen en de testikel en prostaat vertoonden geringe afwijkingen.

Geconcludeerd wordt dat lage doseringen clenbuterol door het voer bij mannelijke ratten positieve effecten heeft op groei, voederconversie en spiergewicht, maar tegelijkertijd leiden tot histopathologische veranderingen in hart, lever, bijnier, thymus, testikel en prostaat. Vergelijkbare histopathologische effecten zijn gerapporteerd bij met clenbuterol behandelde runderen. Op grond van deze effecten lijkt het mogelijk de rat als modeldier voor het rund te gebruiken wat betreft clenbuterol.

## 1 INLEIDING

Illegaal gebruik van clenbuterol als herverdelers is een punt van aandacht voor de vleesproducerende industrie. Met name bij runderen, vleeskalveren en vleesstieren is gebruik van clenbuterol lucratief. Uit dierproeven is gebleken dat gebruik van beta-agonisten, naast een gunstiger vleesvetverhouding, leidt tot degeneratieve veranderingen in de prostaat van geit en kalf (3). Tevens is bij beide diersoorten een toxische hepatitis waargenomen. In de prostaat was de meest opvallende verandering vacuolisatie van het klierweefsel, bij de geit is tevens necrose van klieracini waargenomen. Onderzoek van praktijkmateriaal (7) laat zien dat een zeer groot deel van de onderzochte prostaatcoupes van vleeskalveren deze vacuolisatie vertoont.

In een pilotonderzoek bij vleesstieren werd echter geen vacuolisatie van de prostaat waargenomen. Wel werden degeneratieve afwijkingen aan de testikels gezien en vertoonden de behandelde dieren een toxische hepatitis (6).

Bij ratten is zowel toxiciteitsonderzoek uitgevoerd (12, 18) als proeven betreffende de groeibevorderende effecten van clenbuterol (9, 11, 13, 14, 15, 16, 17). In toxiciteitsstudies bij ratten zijn orale doseringen van 0,5, 2,5, 5 en 25 - 100 mg/kg lichaamsgewicht toegediend via een maagsonde gedurende 13 weken. Hierbij werden tot 5 mg/kg geen duidelijke effecten gevonden, maar wel vanaf 25 mg/kg (overmatige activiteit, uitpuilende ogen, krampen en sterfte) (18). De volgende organen zijn hierbij gewogen en histologisch onderzocht: hart, lever, long, nier, milt, thymus, hersenen, hypofyse, schildklier, bijnier, prostaat, testis en ovaria. Alleen bij de met krampen gestorven dieren werden afwijkingen gevonden (longoedeem, hyperaemie longvaten, erythrodiapedesis en leverstuwung). In een 18 maanden durend experiment werden dieren behandeld met doseringen van 0,1, 0,5 en 2,5 mg/kg lichaamsgewicht via het voer. De behandelde dieren hadden een wat grotere voeropname en groeiden wat meer dan de controles. De glycogeengehalten in hart en skeletspieren waren wat lager dan in de controles. Verder werden geen duidelijke afwijkingen geconstateerd. Er is histologisch onderzoek uitgevoerd aan een groot aantal weefsels en organen. Als enig effect werd een dosisafhankelijke bradycardie waargenomen (18). De orale LD50 voor ratten is vastgesteld op 315 mg/kg, 1 mg/kg wordt beschouwd als de maximaal tolereerbare dosering in perinatale toxiciteitstesten (12).

Naast toxiciteitsstudies zijn ook herverdelingsstudies bij ratten uitgevoerd. Hiervoor zijn veel lagere doseringen toegepast, n.l. 2,5, 25 en 50 mcg/kg i.m. gedurende 21 dagen bij volwassen vrouwelijke ratten (14). Dit resulteerde in een sterke toename van de dagelijkse gewichtstoename (resp. 60 %, 60% en 100 % meer dan de controle), een afname van het relatieve levergewicht (4 % voor de controles, 3,5 % bij de behandelde dieren) en een significante verhoging van UDPGT (UDP-glucuronyltransferase) activiteit in de lever. Uteri van de behandelde ratten waren vergroot en gevuld met mucus secreet. De serum oestradiol en progesteron gehalten waren echter verlaagd bij de twee hogere doseringen. Re (15, 16) gebruikte dezelfde doseringen (ook i.m.) en behandelingstijd bij vrouwelijke ratten. Ook hij vond een mucometra bij de behandelde dieren en de ovaria vertoonden tekenen van verminderde activiteit. Histologie is alleen gedaan op de uterus en ovaria. In de uterus vond men verwijding van de klieren, welke bekleed waren met plat epitheel, in de ovaria oude corpora lutea en atretische tertiaire follikels. Er was een toename in het oestrogenreceptor gehalte in de uterus van de twee hoogste doseringsgroepen gevonden. Progesteronreceptorconcentraties waren niet veranderd. De groei en voederconversie waren verbeterd bij de behandelde dieren. De groei was resp. 31 %, 56 % en 107 % meer dan de controles. Serum oestradiol en progesteron waren verlaagd (niet significant). Van de leverenzymen was de UDPGT activiteit verhoogd (35,6 %).

Hesketh, (9) onderzocht eiwit aanzet in de musc. gastrocnemius bij mannelijke ratten van 60 gram behandeld gedurende 1, 2, 4 en 7 dagen met voer waarin 2 mg/kg (2 mcg/g) clenbuterol. Na twee dagen was het spiergewicht 9 % verhoogd, na 7 dagen was dit effect nog sterker (50 % toename netto gewicht). Er is geen histologisch onderzoek uitgevoerd. Maltin (13) gebruikte doseringen van 2 mcg/rat/dag via het voer en zag na 7 dagen een toename van de skeletspiermassa van 21 %. Sillince (17), behandelde vrouwelijke ratten (120 gram) oraal via het voer en per injectie (s.c. of i.m.) met

clenbuterol gedurende 10 dagen in een dosering van 0.3 mg/kg lichaamsgewicht. Ook hier werd 22 % meer groei, een betere voederconversie, 26 % zwaardere pootspieren, een 27 % zwaarder hart en 30 % minder vet waargenomen. Er is geen histologisch onderzoek uitgevoerd. Ook Kim (11), meldt bij ratten een toename van de skeletspiermassa van 20-30 % na 8-14 dagen behandelen met clenbuterol (dosering niet genoemd).

Uit deze literatuurgegevens blijkt dat bij de rat hoge doseringen clenbuterol toxisch effecten veroorzaken als gevolg van sympathicomimetische stimulatie ( $\beta_2$ -effecten op hart, spieren, longen), terwijl veel lagere doseringen positieve effecten hebben op de groei en spieraanzet en hormonale effecten hebben op de geslachtsorganen.

In deze proef worden de effecten van subacute orale toediening van lage doseringen clenbuterol bij de rat in kaart gebracht. Dit om mogelijke effecten te bepalen bij mannelijke ratten en tevens om na te gaan of de rat als modeldier voor het rund kan dienen voor wat betreft het bestuderen van effecten als gevolg van het gebruik van clenbuterol.

## 2 MATERIAAL EN METHODEN

### 2.1 Proefdieren

De dierproef is uitgevoerd op het Centrum voor Kleine Proefdieren (CKP) van de Landbouw Universiteit te Wageningen. Er zijn 8 mannelijke ratten voor het experiment gebruikt, 6 dieren zijn gevoerd met clenbuterolhoudend voer, 2 dieren kregen controlevoer.

De dieren werden in groepjes van 2 dieren per kooi op bedding gehouden. De voeding bestond uit AIN 76 ad lib en drinkwater ad lib. De ratten waren aan begin van de proef 6 weken oud, aan het eind 10 weken. De proefdieren waren gehuisvest in een gesloten afdeling met afzuiging (in de ballon). De proefdieren kregen, na een week gewenperiode, gedurende 28 dagen gemedicineerd voer, de controledieren kregen de gehele periode voer zonder clenbuterol. Na 28 dagen zijn de dieren doodgemaakt door ethernarcose en decapitatie.

### 2.2 Proefschema:

groep A: geen clenbuterol (2 dieren, dier 506 en 507)

groep B: 0,1 mcg/kg lichaamsgewicht clenbuterol (2 dieren, dier 501 en 509)

groep C: 50 mcg/kg lichaamsgewicht clenbuterol (2 dieren, dier 503 en 504)

groep D: 0,1 mg/kg lichaamsgewicht clenbuterol (2 dieren, dier 505 en 508)

Dosering clenbuterol door het voer.

A: Controle alleen AIN zonder toevoegingen

B: AIN met 1 mcg/kg clenbuterol

C: AIN met 0,5 mg/kg clenbuterol

D: AIN met 1 mg/kg clenbuterol

Clenbuterol (clenbuterol hydrochloride C 5423) is gekocht bij Sigma Chemie Zwijndrecht, Nederland.

### 2.3 Bepalingen

De groei per dier per dag, de voer- en wateropname per week, per dier en per groep zijn geregistreerd. Bij de sectie is gekeken naar mogelijke macroscopische pathologische afwijkingen.

Bij sectie zijn de volgende organen gewogen: hart, testis, prostaat, lever, nieren, bijniere, schildklier, long, milt, thymus en spier (musculus gastrocnemius).

Er is histologisch onderzoek verricht op de volgende organen: prostaat, testis (beide), lever, nieren (beide), schildklier, ogen (één), bijnier (beide), long, milt, thymus, spier (m. gastrocnemius), hart en trachea.



Alle organen zijn gefixeerd in 4 % gebufferde formaldehyde, behalve de testes waarbij 1 testikel gefixeerd is in 4 % gebufferde formaline en de andere gefixeerd is in Bouin's Hollands fixatief. Na routinematige inbedding in paraffine zijn coupes gesneden van 5 µm dik. De coupes zijn gekleurd met Haemaluin-Eosine overzichtskleuring volgens Mayer (HE), Weigert Van Gieson (WVG) bindweefselkleuring, Periodic Acid Schiff (PAS) glycogeen/koolhydraatkleuring. De prostates zijn tevens gekleurd met de gecombineerde Alcian Blauw-Periodic Acid Schiff (AB-PAS) kleurtechniek voor zure en neutrale mucines. De levers zijn tevens gekleurd met Perls Prussian Blue (PPB) voor ijzer, Fouchet voor gal, Di-Methyl Amino Benzylidine Rhodanine (DMABR) koperkleuring en Diaminobenzidine (DAB) voor aankleuring van endogene peroxidase activiteit.

Als extra controlemateriaal zijn coupes gebruikt van 10 controleratten (5 mannelijke en 5 vrouwelijke dieren) van dezelfde leeftijd uit een andere proef. Tevens is een extra controledier meegenomen om sectie-ervaring op te doen. Dit dier, nr. 500, is een week eerder doodgemaakt dan de andere dieren.

### 3 RESULTATEN

#### 3.1 Zoötechniek

De proef is zonder problemen verlopen. Er was geen uitval en de dieren namen het gemedicineerde voer goed op. De eindgewichten van de dieren en de gewichten van de organen zijn weergegeven in Tabel 1. Hoewel het hier om een pilotproef met een zeer beperkt aantal dieren gaat, zijn enkele tendenzen waarneembaar.

De dieren uit groep C en D waren wat zwaarder dan de controles. Dit gold ook voor de gewichten van de spieren en het hart. Het gewicht van de levers van met clenbuterol behandelde dieren uit groep C en D was lager dan dat van de controledieren.

Het voer en waterverbruik is weergegeven in de Tabel 2. Er was geen verschil in voerverbruik tussen de groepen. Het waterverbruik van groep B was groter dan dat van de andere proefgroepen.

Ook de groei per dier per dag is weergegeven in Tabel 2. De dieren van groep C en D bereikten een hoger eindgewicht en hadden een wat grotere groei per dier per dag. Een betere groei in combinatie met een gelijk voergebruik impliceert een betere voederconversie (= kg voer/kg groei).

#### 3.2 Histopathologie

Bij de sectie werden geen afwijkingen bij de dieren waargenomen. Bij histologisch onderzoek werden de volgende waarnemingen gedaan:

##### Lever

De leverafwijkingen bij groep B bestonden uit galgangproliferatie, solitaire cel necrose (apoptosis) en plaatselijk kernveranderingen, bij groep C waren galgangproliferatie, apoptosis (foto 1), toename van lymfocyttaire infiltratie, activatie van Kuppfercellen opvallend en bij groep D galgangproliferatie (foto 2), wat periportale fibrose, apoptose, enkele focale necrosehaardjes (foto 3), activatie van de eindplaat, activatie van Kuppfercellen en wat lymfocyttaire infiltratie aanwezig. Tevens waren bij groep D veel afwijkende kernen, dubbelkernen, anisokaryose, kernen met een lichte ring (halo) erom (foto 4) waarneembaar. Bij alle groepen waren ook haardjes van basofiele cellen zichtbaar met name rond de centraalvene (foto 5). De opvallendste veranderingen zijn weergegeven in Tabel 3.

##### Hart

De afwijkingen aan het hart bestonden uit het plaatselijk voorkomen van acidofiele vezels (foto 6) wijzend op spierdegeneratie bij de groepen B, c en D. kernen van deze vezels vertoonden pyknose of waren verdwenen. Er was nauwelijks reactie rond de aangetaste vezels (foto 7).

### Thymus

De thymus vertoonde een toename in het aantal sterreheemelcellen (lytische lymfocyten, foto 8) in de schors en lytische haardjes in het merg bij de groepen C en D.

### Testis

In de testis was bij de dieren uit alle groepen plaatselijk centraal debris in de tubuli waarneembaar. Verder was er een geringe toename van het aantal Sertolicellen en wat degeneratie van de basale gonocyten bij de groepen C en D.

### Prostaat

In de prostaat was een toename van het aantal apoptotische cellen (foto 9) in het epitheel bij de groepen C en D. Perifeer was bij de meeste dieren uit groep B, C en D afwijkend dysplastisch klierweefsel waarneembaar (foto 10). Hierbij was het epitheel onregelmatig en blazig, basale vacuolisatie viel op (foto 11), maar dit zou plaatselijk een artefact kunnen zijn. Ook was er wat meer plat epitheel bij de groepen B, C en D.

### Nier

In de nier waren bij dieren uit alle groepen plaatselijk kalkneerslagen waarneembaar op de schors/merg overgang. Tevens waren bij alle dieren op de schors/merg overgang veel cellen met pyknotische kernen waarneembaar. Bij de dieren uit de groepen C en D waren enkele afwijkende glomeruli met hyperplasie van de juxtaglomerulaire cellen waarneembaar.

### Bijnier

In de bijnier viel op dat bij de dieren uit de groepen C en D de schors, met name de zona fasciculata en reticularis een compact aanzien had doordat de cellen klein waren en eosinofiel aankleurden. Ook waren de cellen veel minder gevacuoliseerd dan de controles.

In de long, schildklier, retina, milt, spier en trachea waren geen duidelijke verschillen tussen de groepen waarneembaar. De beschrijving van de organen van de individuele dieren en de controles zijn weergegeven in bijlage 1.

## DISCUSSIE

Uit de resultaten van de dierproef blijkt dat bij de mannelijke rat op lage doseringen clenbuterol door het voer (0,5-1 mg/kg voer) effecten worden waargenomen op de groei, orgaangewichten van lever, hart, en spieren en histologie van hart, lever, thymus, bijnier, prostaat en testis.

Hoewel de aantallen te klein waren voor statistische verschillen zijn bepaalde tendenzen zichtbaar. In overeenstemming met de literatuur werd een betere groei en voederconversie waargenomen resulterend in een grotere spiermassa. In overeenstemming met Nebbia (14) was een tendens tot lagere levergewichten bij de behandelde dieren van groepen C en D.

In toxiciteitsstudies (12, 18) zijn weinig histologische veranderingen waargenomen. In de later uitgevoerde herverdelingsstudies is, behalve van het vrouwelijk geslachtsapparaat (15, 16), geen histologisch onderzoek uitgevoerd.

In deze proef waren opvallende veranderingen in de lever waarneembaar. Dergelijke veranderingen zijn ook waargenomen bij met clenbuterol en andere  $\beta$ -agonisten behandelde kalveren, stieren en geiten (3, 4, 5, 6). Bij deze diersoorten werd ook een opvallende toename van het vetgehalte in de lever waargenomen. Bij deze ratten proef is het vetgehalte in de lever niet bepaald. Clenbuterol in lage dosering blijkt een duidelijk toxisch effect te hebben op de lever van zowel ratten als herkauwers. Ook bij in vitro onderzoek bleek clenbuterol toxische effecten in de lever te induceren (10).

In tegenstelling tot herkauwers werd bij de ratten spierdegeneratie in het hart waargenomen. Ratten en honden zijn gevoelig voor effecten van sympaticomimetica op het hart (1). Door vasoconstrictie veroorzaakte ischemie leidt tot necrose van spiervezels (2). De adrenerge stimulus

versterkt de transmembrane calcium influx, wat leidt tot een versterkte contractie en contractiefrequentie van de coronairvaten, waardoor extra energie en zuurstof worden verbruikt. De minst doorbloedde gedeelten van het myocard kunnen hierdoor hypoxisch worden en ten slotte degenereren (2).

Wat betreft het geslachtsapparaat zijn bij vrouwelijke dieren histologische effecten waargenomen in de ovaria en uterus (14). Bij mannelijke kalveren en geiten zijn effecten waargenomen op de prostaat (4, 5) en bij stieren op de testis (6). Bij deze mannelijk ratten zijn geringe veranderingen in de prostaat en testis waargenomen, beide van degeneratieve aard. Deze effecten kunnen zowel direct, door veranderde doorbloeding, als indirect via het hypothalamohypofysaire systeem veroorzaakt worden. Bovendien is het mogelijk dat een veranderd metabolisme in de aangetaste lever een bijdrage levert.

De thymus en bijnier vertoonden atrofische verschijnselen. Een oorzaak hiervoor zou een verhoogde sympaticotonus kunnen zijn. Vergelijkbare effecten worden gezien onder invloed van stress (2). Of clenbuterol immuunsuppressieve effecten heeft is uit deze proef niet duidelijk.

Het gebruik van ratten als model voor landbouwhuisdieren lijkt uit deze pilot voor wat betreft clenbuterol goed mogelijk. Niet alleen had de behandeling positieve effecten op groei, voederconversie en spieraanzet, tevens werden histopathologische veranderingen waargenomen die overeenkomsten vertonen met wat is waargenomen bij runderen. In een grotere proef waarbij ook vrouwelijke dieren worden behandeld zal dit model verder gevalideerd moeten worden. Gebruik van ratten in plaats van kalveren kan een enorme kostenbesparing opleveren.

#### 4 CONCLUSIE

Uit deze pilotproef met mannelijke ratten 28 dagen gevoerd met voer waarin in lage dosering clenbuterol was gemengd bleek dat clenbuterol in de doseringen 50-100 mcg/kg lichaamsgewicht duidelijk positieve effecten heeft op groei en voederconversie. Daarnaast was er een toename in spiermassa en een afname in het gewicht van de lever. Histologisch vertoonden de dieren toxische hepatitis, necrotische vezels in de hartspier, atrofie van de thymus en bijnier en degeneratieve effecten op de prostaat en de testis. Deze effecten komen voor een groot deel overeen met wat is waargenomen bij runderen en wijzen op de mogelijkheid van gebruik van ratten als modeldier om histologische effecten van clenbuterol verder te bestuderen. In een grotere proef waarbij ook vrouwelijke dieren worden behandeld zal dit model verder gevalideerd moeten worden.

#### LITERATUUR

1) Balazs, T. and V.J. Ferrans.

Cardiac lesions induced by chemicals.

Environ. Health. Perspect. 1978; 26: 181-191.

2) Gopinath, C. D.E. Prentice, D.J. Lewis.

Atlas of experimental toxicological pathology. Current histopathology, Volume 13.

MTP Press Limited, Lancaster 1987.

3) Groot, M.J.

Histological screening for illegal growth promoting agents in veal calves.

Ph.D. Thesis Utrecht, 1992.

4) Groot, M.J., P.L.M. Berende, G.D. van Bruchem, W. Haasnoot, R. Schilt, A. Lommen en F.A. Huf. Effecten van clenbuterol, oestradiol-17 benzoaat en testosteron propionaat, apart of gecombineerd bij geitebokjes.

RIKILT-DLO rapport 92.38, Wageningen 1992.

- 5) Groot, M.J., P.L.M. Berende, R. Schilt, W. Haasnoot, H. Hooijerink, J.S. Ossenkoppele.  
De effecten van lage doseringen beta-agonisten al of niet gecombineerd met oestradiol, methylthiouracil en dexamethason bij vleeskalveren: resultaten van de dierproef.  
RIKILT-DLO rapport 94.22, Wageningen 1994.
- 6) Groot, M.J., P.L.M. Berende, J.S. Ossenkoppele, P. Stouten, W. Haasnoot, R. Schilt, H. Bannink en J.F. Labrijn.  
Effecten van clenbuterol bij vleesstieren: Pilotstudy.  
RIKILT-DLO rapport 95.11, Wageningen 1995.
- 7) Groot, M.J. en J.S. Ossenkoppele.  
Trends in het histologisch onderzoek in de periode 1987-1993.  
RIKILT-DLO rapport 94.25, Wageningen 1994.
- 8) Groot, M.J., J.S. Ossenkoppele, P.L.M. Berende, R. Schilt and W. Haasnoot.  
Pathological effects of beta-agonistst in calves.  
Second International Symposium on Hormone and veterinary drug residue analysis. Bruges, May 31-June 3, 1994.
- 9) Hesketh, J.E., G.P. Campbell, G.E. Loble, C.A. Maltin, F. Acamovic and R.M. Palmer.  
Stimulation of actin and myosin synthesis in rat gastrocnemius muscle by clenbuterol; evidence for translation control.  
Comp. Biochem. Physiol. 1992; 102C: 23-27.
- 10) L.A.P.Hoogenboom, M. Groot, M.B.M. Huveneers-Oorsprong and A. Lommen.  
Preliminary data on cytotoxic effects of clenbuterol in pig hepatocytes.  
In vitro Toxicological studies and real time analysis of residues in food. FLAIR-Concerted action No. 8. Proceedings of the workshops held in Liège, April 30- May 01, 1993 and Nantes, October 22-23, 1993.
- 11) Kim, Y.S. and R.D. Sainz.  
Minireview  $\alpha$ -adrenergic agonists and hypertrophy of skeletal muscles.  
Life Sc. 1991; 50: 397-407.
- 12) Lehman, H. Von.  
Reproduktionstoxicologische Untersuchungen mit Clenbuterol (NAB 365).  
Arzneim. -Forsch, 1976; 26, 7a: 1427-1427-1435.
- 13) Maltin, C.A., M. Delday, D.N. McMillan, B.S. Noble, F. Bain and R.M. Palmer.  
The cyclo-oxygenase inhibitor fenbufen blocks clenbuterol-induced hypertrophy of cardiac but not skeletal muscle.  
Proc. Anat. Soc. Gr. Brit. Ireland.
- 14) Nebbia, C. E. Ferrero, M. Dacasto, G. Re and P. Badino.  
Effects of the repeated administration of clenbuterol on hepatic drug metabolism.  
Act. Vet. Scan. 1991; Suppl. 87: 419-421.
- 15) Re, G. P. Badino, M. Dacasto, S. Racca, F. Valenza, F. di Carlo and C. Girardi.  
Endocrine effects of a  $\beta$ -agonist (clenbuterol) on the genital tract of female rats.  
Europ. J. Pharmacol. 1990; 183: 175-176.

16) Re, G., P. Badino, M. Dacasto, C. Nebbia, B. Biolatti, F. di Carlo, C. Girardi.  
Effects of long-term administration of clenbuterol in mature female rats.  
Am. J. Vet. Res. 1993; 54: 438-442.

17) Sillence, M.N., W.G. Spiers and D.B. Lindsay.  
Effects of clenbuterol and receptorantagonists on growth in rats.  
Proc. Aust. Soc. Anim. Prod. 1990; 18: 550.

18) Ueberberg, H. Von.  
Tierexperimentelle Untersuchungen zur Verträglichkeit von NAB 365 (Clenbuterol).  
Arzneim. -Forsch, 1976; 26, 7a: 1420-1427.

Tabel 1. Gewichten in grammen van de dieren en de organen bij sectie

Diernummer	Diergewicht	Prostaat	Testes	Lever	Bijnieren	Nieren	Thymus	Long	Spier	Hart	Milt
A 500	*	0,40	2,08/2,14	21,69	0,06/0,06	1,52/1,56	0,79	1,70	1,87	1,41	0,94
A 506	362.6	0,20	1,93/1,99	17,14	0,02/0,03	1,48/1,41	0,80	2,46	2,16	1,30	0,83
A 507	366.1	0,13	2,02/2,08	16,71	0,04/0,04	1,46/1,45	0,86	1,72	2,56	1,45	0,88
B 501	361.4	0,36	2,17/2,48	16,81	0,04/0,04	1,37/1,35	0,76	1,46	1,90	1,40	0,84
B 509	381.4	0,19	2,02/2,04	16,68	0,05/0,06	1,60/1,54	0,86	2,54	2,03	1,55	0,81
C 503	378.7	0,35	2,12/2,05	14,63	0,05/0,04	1,57/1,53	0,82	1,83	2,52	1,54	0,83
C 504	401.5	0,54	2,32/2,39	17,20	0,03/0,05	1,40/1,47	0,98	2,10	2,52	1,61	0,99
D 505	388.4	0,51	2,22/2,21	15,34	0,03/0,04	1,27/1,31	0,72	1,65	2,40	1,46	0,79
D 508	379.0	0,28	2,10/2,18	15,50	0,04/0,03	1,51/1,49	0,87	1,70	2,57	1,48	0,86

Dier 500 (9 weken oud)

Dier 501 t/m 509 (10 weken oud)

Dier 500 - 506 - 507 = Groep A: Controle

Dier 501 - 509 = Groep B: 1 mcg/kg clenbuterol in het voer

Dier 503 - 504 = Groep C: 0,5 mg/kg clenbuterol in het voer

Dier 505 - 508 = Groep D: 1 mg/kg clenbuterol in het voer

Tabel 2. Groei, voer- en waterverbruik per dier en groep per dag en per week.

Groep clenbuterol in dieet (%)	dag	gemiddeld gewicht	groei per dier per dag	voer per dier per dag	water per dier per dag	n
A (controle)	7	179.2	8.2	21.6	32.1	2
	14	236.5	9.9	23.7	35.3	2
	21	292.9	6.5	24.4	34.0	2
	28	332.4	3.6	25.0	33.1	2
gemiddeld		364.4	7.1	23.7	33.6	2
B (1 mcg/kg)	7	180.8	8.1	22.9	50.4	2
	14	237.6	8.7	23.5	46.9	2
	21	295.4	7.7	25.0	50.7	2
	28	338.4	4.4	25.5	46.3	2
gemiddeld		371.4	7.2	24.2	48.6	2
C (0,5 mg/kg)	7	184.5	9.6	21.4	30.5	2
	14	251.5	10.1	24.4	39.8	2
	21	314.2	8.6	25.0	41.2	2
	28	358.5	4.2	25.1	31.1	2
gemiddeld		390.1	8.2	24.0	35.7	2
D (1 mg/kg)	7	179.7	9.2	20.2	30.8	2
	14	244.4	10.1	23.0	35.3	2
	21	304.6	8.1	24.3	31.9	2
	28	347.1	5.3	25.1	33.2	2
gemiddeld		383.7	8.2	23.2	32.8	2

Tabel 3. Histologische afwijkingen in de lever.

lever per groep	A (controle)	B (1 mcg/kg)	C (0,5 mg/kg)	D (1 mg/kg)
galgangproliferatie	- - -	+	+/- -	+/- +/-
single cell necrose	- - -	+	- +	+ +
basofiele haardjes	- + +	+	- ++	+ ++
periportaal oedeem	- +/- -	- -	+/- -	+/- +
activatie Kuppfers	- - -	- -	+ +	+ ++
necrose haardjes	- - +/-	+/- +/-	+/- +/-	+ +
glycopeen	+/- +/- +/-	+ +	+ +	+ -
kernveranderingen	- - -	+/- +/-	+/- +	+ +

- = niet aanwezig
- +/- = in geringe mate
- + = matig
- ++ = sterk
- +++ = zeer sterk



Foto 1: Lever van een dier uit groep C, apoptotische cel (pijl), HE 400 x.

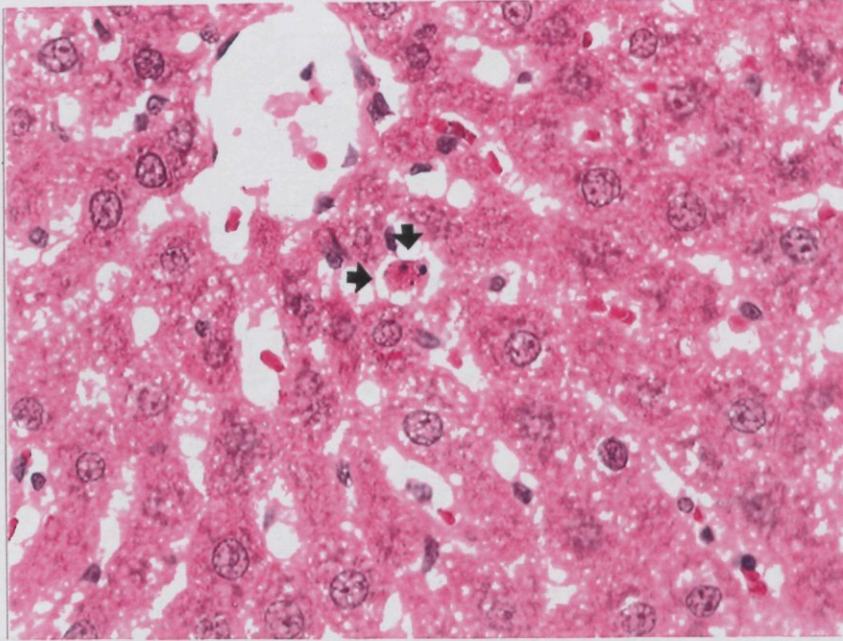


Foto 2: Lever van een dier uit groep D, galgangproliferatie (pijlen), HE 250 X.

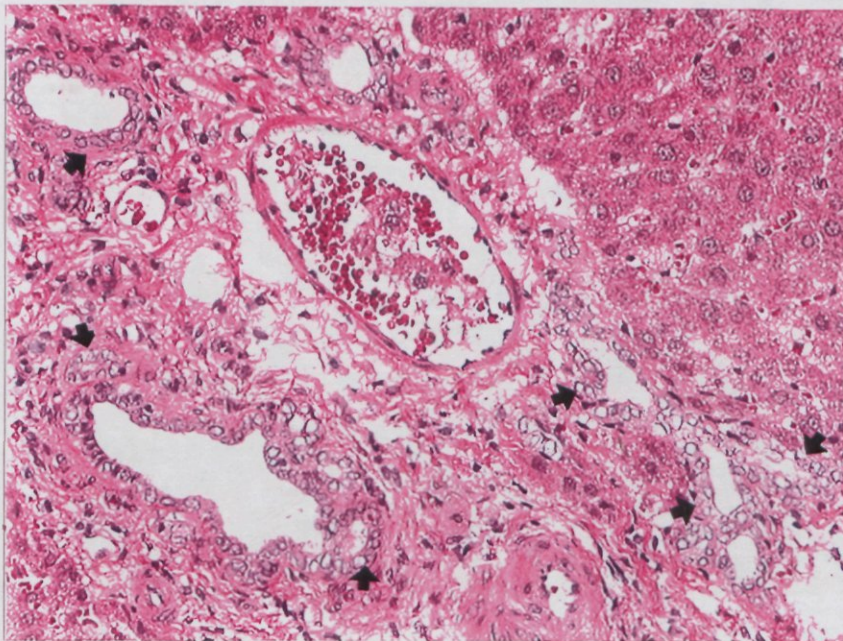




Foto 3: Lever van een dier uit groep D, necrosehaardje (pijlen), HE 250 x.

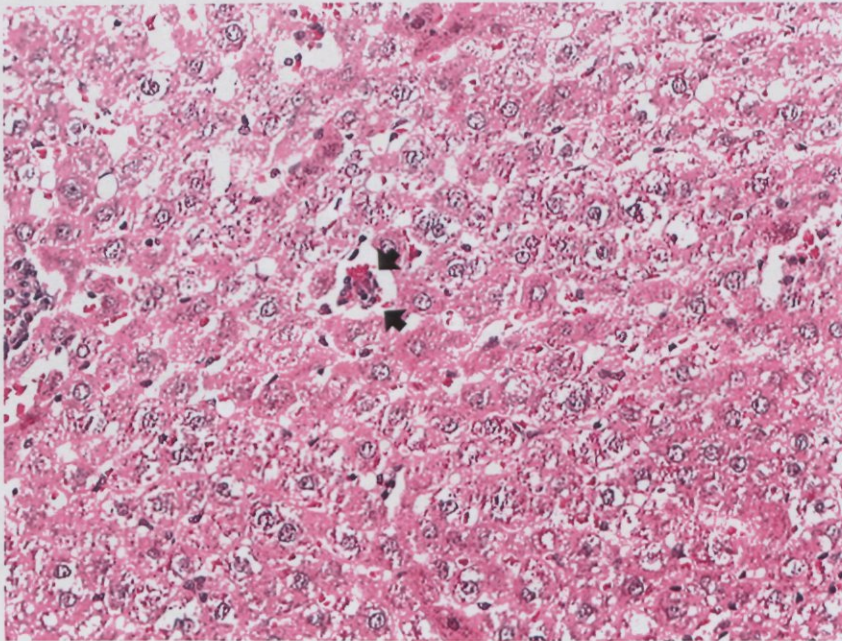


Foto 4: Lever van een dier uit groep D, cellen met een halo (pijl), HE 400 x

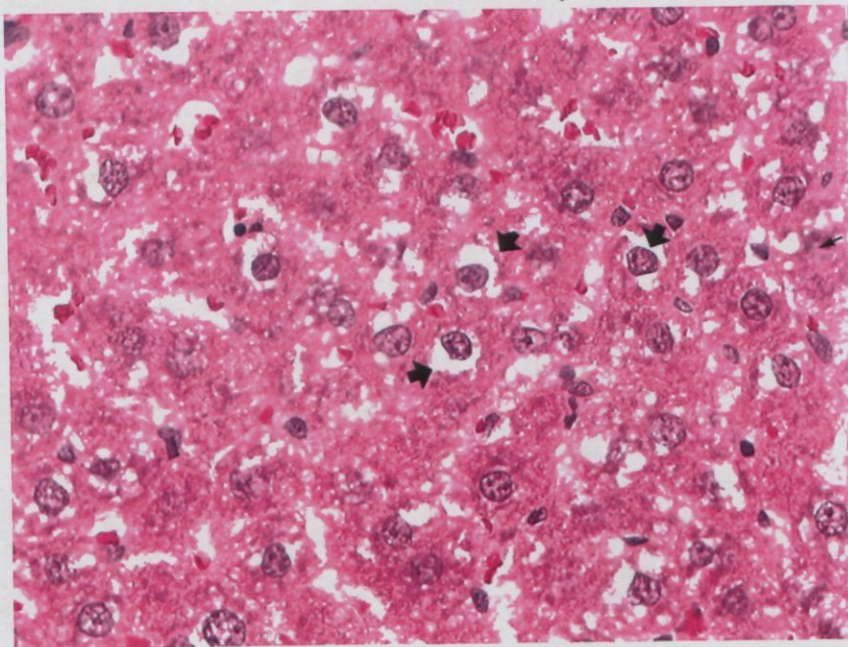




Foto 5: Lever van een dier uit groep D, basofiele cellen (pijl) bij de centraal vene, HE 400 x.

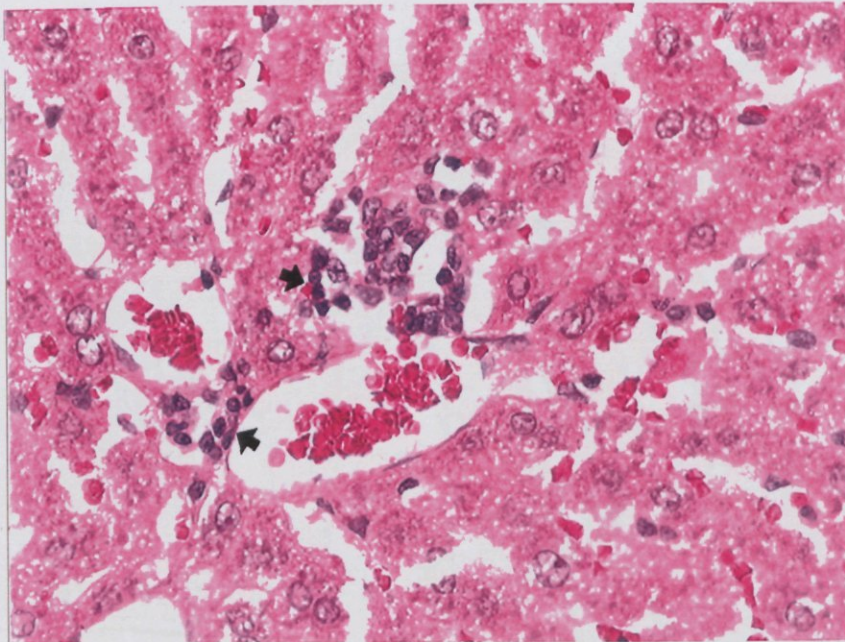


Foto 6: Hart van een dier uit groep B, gedegeneerde spiervezels (pijl), HE 400 x

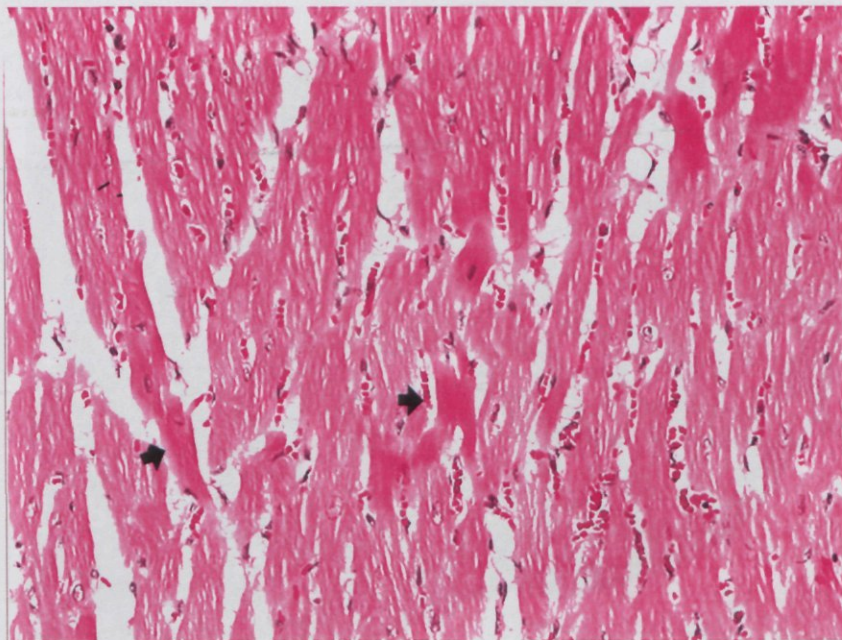




Foto 7: hart van een dier uit groep D, bundel gedegeneerde spiervezels (pijlen), het cytoplasma kleurt eosinofiel dan de normale vezels, terwijl de kernen kleiner en donkerder zijn.

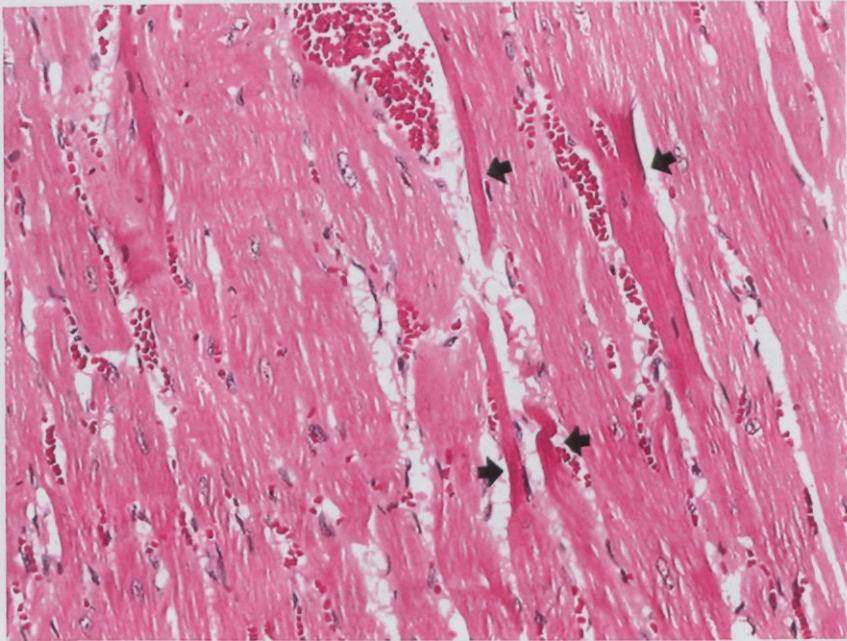


Foto 8: Thymus van een dier uit groep D; schors, toename van het aantal lytische lymfocyten, zogenaamde sterrehemelcellen (pijltjes) HE, 250 x.

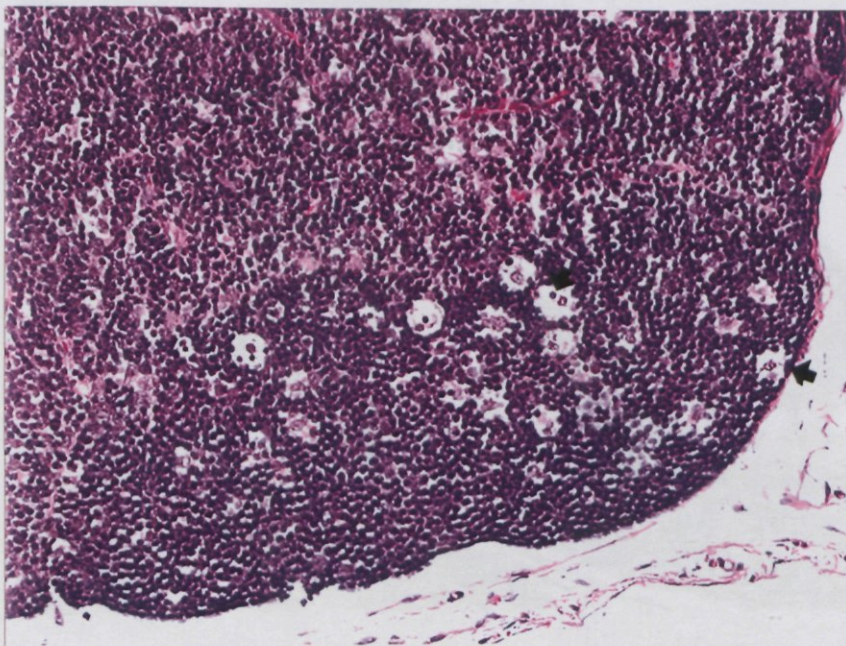




Foto 9: Prostaat van een dier uit groep B, apoptose in het normale epitheel (pijl), HE 400 x.

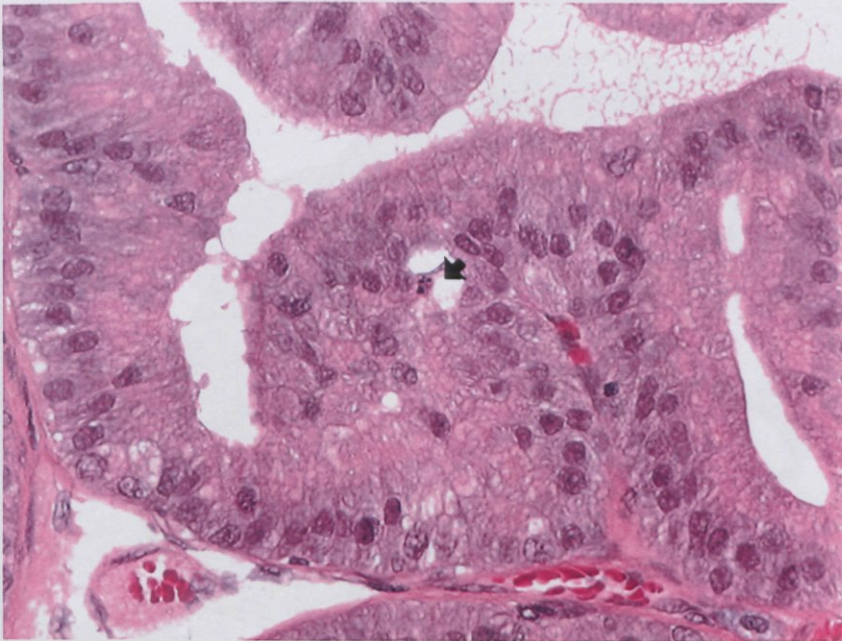


Foto 10: Prostaat van een dier uit groep B, afwijkend epitheel perifeer met vacuolen (pijl) HE 250 x.

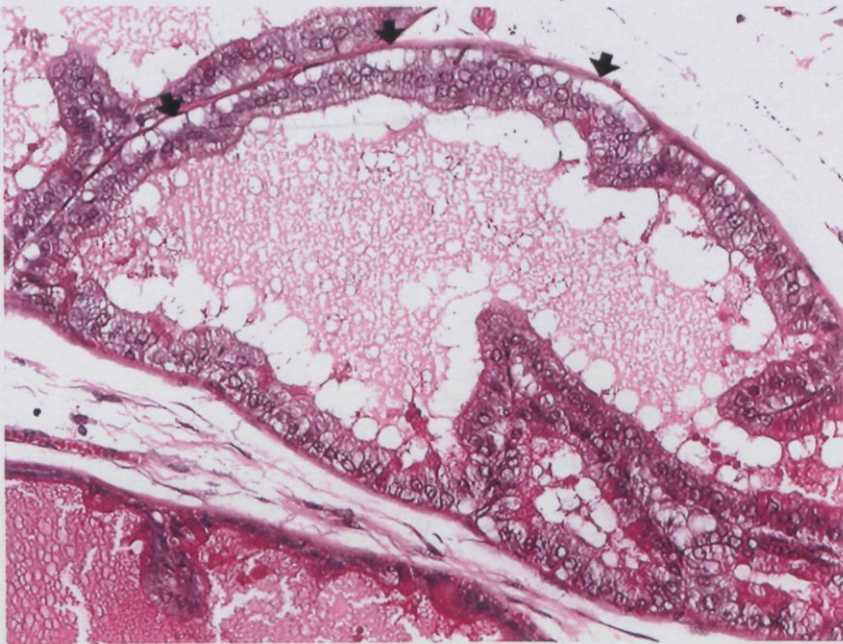




Foto 11: Prostaat van een dier uit groep B, onregelmatig, blazig epitheel met vacuolen (pijl) HE 250 x.

