

Project 505.0022

Ontwikkeling methoden histologisch hormoononderzoek

Projectleider: dr M.J. Groot

Rapport 92.38

september 1992

Effecten van clenbuterol, oestradiol-17 β benzoaat en testosteron propionaat, apart of gecombineerd, bij geitebokjes.

M.J. Groot, P.L.M. Berende, G.D. van Bruchem, W. Haasnoot, R. Schilt, A. Lommen en F.A. Huf

DLO-Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT-DLO)

Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen

Postbus 230, 6700 AE Wageningen

Telefoon 08370-75400

Telex 75180 RIKIL

Telefax 08370-17717

VERZENDLIJST

INTERN:

directeur

hoofden onderzoekafdelingen

dr. M.J. Groot

ir. P.L.M. Berende

drs. R. Schilt

dr. ir. A. Lommen

dr. F.A. Huf

G.D. van Bruchem

W. Haasnoot

J.F. Labrijn

hoofd PR en Secretariaat (2x)

circulatie

bibliotheek (3x)

EXTERN:

Dienst Landbouwkundig Onderzoek

Directie Milieu, Kwaliteit en Voeding

Directie Wetenschap en Technologie

Stichting Kwaliteitsgarantie Vleeskaalvesector

ABSTRACT

Effecten van clenbuterol, oestradiol-17 β benzoaat en testosteron propionaat, apart of gecombineerd, bij geitebokjes.

Effects of clenbuterol, 17 β -estradiol benzoate and testosterone propionate alone and in combinations in male goat kids.

Report 92.38

September 1992

M.J. Groot, P.L.M. Berende, G.D. van Bruchem, W. Haasnoot, R. Schilt, A. Lommen and F.A. Huf

State Institute for Quality Control of Agricultural Products (RIKILT-DLO)

P.O. Box 230, 6700 AE Wageningen, the Netherlands

Physiological and morphological parameters are determined in male goat kids treated with clenbuterol, 17 β -estradiol benzoate and testosterone propionate alone and in combinations. Zootechnical results, histological findings, steroid and clenbuterol levels in plasma and urine, NMR results concerning physiological changes in urine composition and chemical composition of some muscles are reported.

Keywords: screening methods, goats, beta-agonists, estrogens, androgens, histology, NMR, immunoassay, urine plasma, muscles, growth

VOORWOORD

Deze studie is mede mogelijk gemaakt door financiering door de Stichting Kwaliteitsgarantie Vleeskalverensector (SKV).

De auteurs zijn dankbaar voor de ondersteuning vanuit de Directie Milieu, Kwaliteit en Voeding (MKV) van het Ministerie van Landbouw, Natuurbeheer en Visserij.

- De Heer H. v.d. Voet, Groep Landbouwwiskunde, Dienst Landbouwkundig Onderzoek (GLW-DLO) wordt bedankt voor de statistische ondersteuning.
- Dr. J.C. Coert van Intervet B.V. te Boxmeer voor het fabriceren en ter beschikking stellen van de preparaten met anabole stoffen.
- Dr. A.E. van de Braak en Ing. G. van Trierum van Denkavit Nederland B.V. te Voorthuizen voor hun kritische opmerkingen over de proefopzet en hun technische adviezen over de voeding, huisvesting en verzorging van de geiten.
- Denkavit Nederland B.V. te Voorthuizen voor het beschikbaar stellen van de kunstmelkpoeder.
- De heer J. Truin van het IVVO voor de snelle en enthousiaste wijze waarop hij zich het "houden" van geiten eigen heeft gemaakt alsook voor de vlotte en accurate wijze van uitvoeren van de proef.
- Drs. H. Wiersma en A. Hoeve voor de hulp bij het slachten en uitprepareren van de organen en weefsels.
- De heren R.G. Coors, A. de Koning, G. Cazemier en J.F. Labrijn worden bedankt voor hun bijdrage aan de chemische bepaling zoals genoemd in hoofdstuk 6.

INHOUD	<u>blz</u>
ABSTRACT	1
VOORWOORD	2
SAMENVATTING	5
1 INLEIDING	7
2 ZOOTECHNISCH VERSLAG	8
3 HET HISTOLOGISCH ONDERZOEK	15
4 DE GEHALTEN CLENBUTEROL, 17β-OESTRADIOL EN 17β-TESTOSTERON IN URINE EN PLASMA	23
5 NMR ONDERZOEK AAN URINE EN SPIERWEEFSEL	37
6 CHEMISCHE ANALYSE VAN GEHALTEN AAN EIWIT, VOCHT EN VET IN SPIERWEEFSEL	43
7 CONCLUSIES EN DISCUSSIE	46
LITERATUUR	50
BIJLAGEN	
1 T/M 6	

SAMENVATTING

Geitebokjes van 2 maanden oud zijn gedurende 4 weken behandeld met clenbuterol (Clen) per os, oestradiol-17 β benzoaat (E2) per injectie of testosteron propionaat (T) per injectie. De dieren waren verdeeld in 8 behandelingsgroepen: groep 1 controle; groep 2 clenbuterol; groep 3 oestradiol-17 β benzoaat; groep 4 clenbuterol + oestradiol-17 β benzoaat; groep 5 testosteron propionaat; groep 6 clenbuterol + testosteron propionaat; groep 7 oestradiol-17 β benzoaat + testosteron propionaat; groep 8 clenbuterol + oestradiol-17 β benzoaat + testosteron propionaat.

De verschillen in groei tussen de verschillende proefbehandelingen waren i.h.a. niet groot.

De met clenbuterol behandelde dieren hadden wat zwaardere spieren, terwijl de met anabolen behandelde dieren tenderden naar een wat snellere groei. De verschillen m.b.t. de bloedkarakteristieken waren niet groot en wezen niet eenduidig naar een bepaalde proefbehandeling, zelfs niet voor ureum- en lipidengehalten. Deze laatste zouden naar verwachting wel beïnvloed moeten zijn (anabolic en repartitioning agents).

De variatie in gewichten van verschillende organen was groot, behalve die van hart en nier. Ook hier waren er weinig systematische verschillen. Alleen de gewichten van de thymus en testikels van de dieren van de E/T groep waren wat lager dan die van de overige groepen. Clenbuterol lijkt in deze geen grote invloed gehad te hebben.

Uit histologisch onderzoek bleek dat clenbuterol degeneratieve veranderingen veroorzaakte in de geslachtsorganen, lever, pancreas en thymus. De veranderingen in de prostaat bestonden uit degeneratie van het epitheel van de urethra en het klierweefsel. In het klierweefsel werden heldere vacuoles waargenomen en necrose van acini. Deze veranderingen zouden gebruikt kunnen worden voor screening op het gebruik van deze stoffen.

De met E2 behandelde dieren vertoonden metaplastische woekeringen in het klierweefsel van de prostaat en bulbourethraalklier en degeneratie van het kiemepitheel van de testis. De met T behandelde dieren vertoonden hyperplasie van de accessoire geslachtsklieren en degeneratie van de testis. In de E2+T behandelde dieren was de degeneratie van de testis het duidelijkst.

Bij met Clen+E2 en Clen+E2+T behandelde dieren waren de door oestrogenen geïnduceerde metaplasie en de door clenbuterol veroorzaakte degeneratie naast elkaar waarneembaar.

Clenbuterol. De gehalten aan clenbuterol, 17 β -oestradiol en 17 β -testosteron zijn onderzocht in bloedplasma en urine. Hierbij werd gebruik gemaakt van een op het RIKILT ontwikkelde enzymimmunoassay (EIA) voor de bepaling van clenbuterol en commercieel verkrijgbare radioimmunoassays (RIA's) voor de bepaling van 17 β -oestradiol en 17 β -testosteron.

Het gehalte aan clenbuterol in de urine van met clenbuterol behandelde proefdieren (oraal gedurende vier weken; circa 10 μ g clenbuterol per kg lichaamsgewicht) varieerde van <3 tot 70 ng/ml. Alhoewel niet significant ($p=0,08$) leek toediening van testosteron tot een verlaging van het clenbuterol in de

urine te leiden. De gehalten aan clenbuterol in bloedplasma waren zoals verwacht zeer laag.

17 β -oestradiol. Toediening van 17 β -oestradiol (wekelijks, gedurende vier weken 2 mg 17 β -oestradiolbenzoaat intramusculair geïnjecteerd) en in combinatie met 17 β -testosteron(propionaat) en/of clenbuterol resulteerde bij alle proefdieren in enigermate een verhoogd gehalte aan 17 β -oestradiol in de urine. Bij drie van de vijf met 17 β -oestradiol behandelde dieren werd in tijdens de proefperiode genomen monsters een goede correlatie gevonden tussen de gehalten in bloed en urine, waarbij in urine 15-20 maal hogere gehalten werden gevonden. In plasma werd tijdens de proefperiode een duidelijk verhoogd 17 β -oestradiolgehalte gevonden. Op de slachtdatum was het gehalte in plasma echter zodanig afgenomen dat 17 β -oestradiol niet meer aantoonbaar was (< 0,02 ng/ml). Opmerkelijk was het feit dat toediening van clenbuterol leidde tot een significante toename van de gehalten aan 17 β -oestradiol ($p=0,03$) in de urine.

17 β -testosteron. Door toedienen van 17 β -testosteron (wekelijks, gedurende vier weken 20 mg 17 β -testosteronpropionaat intramusculair geïnjecteerd) worden geen significant verhoogde 17 β -testosterongehalten, ten opzichte van de van nature voorkomende gehalten bij de controledieren, in de urine gevonden. Eerder was er sprake van een trend tot verlaging. In bloedplasma werd slechts op één dag een verhoogd 17 β -testosterongehalte gevonden. Gelet op de mogelijke interacties tussen de verschillende stoffen, werd een significant verband gevonden tussen de toediening van clenbuterol en een verhoging van de gehalten van 17 β -testosteron in het plasma ($p=0,02$). Voor urine was dezelfde trend zichtbaar, zij het niet significant ($p=0,19$).

De van nature voorkomende gehalten van 17 β -oestradiol en 17 β -testosteron in plasma en urine bij de mannelijke geitelammeren komen in grote mate overeen met die van mannelijke kalveren (Arts et al., 1989). Behandeling met 17 β -oestradiol geeft ook vergelijkbare gehalten, zij het dat de relatie tussen moment van injectie en de piek plasmaconcentratie gedurende de proef verschuift.

Wat betreft de gehalten van de natuurlijke hormonen en de effecten van behandeling lijkt de geit mogelijk bruikbaar te zijn als modeldier voor het kalf.

NMR onderzoek naar de samenstelling van de urine gaf aan dat behandeling met clenbuterol een verhoging van het L-lactaatgehalte gaf, terwijl het creatinegehalte daalde. Deze L/C ratio is indicatief voor het gebruik van groeibevorderende middelen. Ook behandeling met anabolen gaf een verhoogde L/C ratio te zien bij de behandelde dieren.

De samenstelling van het spierweefsel werd door behandeling met Clen in zoverre veranderd dat de hoeveelheid intramusculair vet afnam, ook wanneer Clen werd gecombineerd met anabolen. Dit werd zowel chemisch als met NMR vastgesteld. De hoeveelheid eiwit en vocht per gram spierweefsel werd niet beïnvloed.

1 INLEIDING

Illegale toepassing van beta-agonisten als herverdelers is een grootschalig probleem in de vleeskalversector. Bovendien wijzen gegevens van het Centraal Laboratorium voor de Keuring van Vee en Vlees (Frijns, 1992) en histologisch onderzoek (Groot, 1992) op mogelijk gecombineerd gebruik van beta-agonisten en natuurlijke hormonen. Uit enkele literatuurgegevens blijkt, dat deze combinatie van anabole steroïden met een beta-agonist een zeer duidelijke groeibevordering geeft.

Het is hierom van groot belang dat snelle, goedkope screeningsmethoden worden ontwikkeld om dit gebruik te kunnen controleren. Hiervoor is het noodzakelijk meer inzicht te verkrijgen in het werkingsmechanisme en de biologische effecten van deze stoffen. Hiertoe dienen de gehalten van beta-agonisten in vlees, bloed en urine te worden vastgesteld en moeten de fysiologische en morfologische effecten van deze stoffen worden bestudeerd.

Om deze data te verzamelen is een dierexperiment uitgevoerd met geitebokjes als modeldieren voor mannelijke vleeskalveren. Uit eerdere experimenten (Groot, 1992) is gebleken dat jonge bokjes, voor wat betreft de histologie van de prostaat, overeenkomstig reageren op behandeling met hormonen als vleeskalveren. Voordelen van het gebruik van bokken in plaats van kalveren zijn hun kleinere afmetingen, waardoor minder voer en dierbehandelingsmiddelen nodig zijn, en hun geringe economische waarde, waardoor de schade door destructie van behandelde dieren beperkt is.

Als beta-agonist is gekozen voor clenbuterol omdat dit de meest bekende en meest werkzame stof is. De gekozen hormoonpreparaten zijn oestradiol-17 β benzoaat en testosteron propionaat, een in de "praktijk" bekende cocktail.

Van beta-agonisten en ook van (natuurlijke) anabole steroïden is bekend dat ze invloed hebben op de hormoonproductie c.q. -afgifte en ook hun invloed op de chemische samenstelling van het spierweefsel wordt in de literatuur genoemd. Genoemde stoffen verhogen de N-aanzet en verlagen de vetaanzet (repartitioning), maar wat hun invloed op de vleeskwaliteit betreft lopen de meningen uiteen. Daarom zal in dit onderzoek ook de invloed op de spiersamenstelling en vleeskwaliteit meegenomen worden. Door de nieuwste ontwikkelingen staat ons daarvoor NMR apparatuur beschikbaar om de verschillen tussen de diverse proefbehandelingen vast te stellen m.b.t. genoemde aspecten. Het doel van dit onderzoek is gegevens te verzamelen over de onderlinge interacties tussen beta-agonisten en de natuurlijke anabole steroïden, om zo tot de ontwikkeling te komen van geschikte screeningsmethoden.

Hoofdstuk 2 beschrijft de zoötechnische resultaten van de dierproef. In hoofdstuk 3 worden de resultaten van het histologisch onderzoek besproken. Eerst worden de veranderingen in de prostaat beschreven, dan de veranderingen in de overige organen.

In hoofdstuk 4 worden de gehalten clenbuterol en hormonen in plasma en urine gerapporteerd. Hoofdstuk 5 gaat over de resultaten van het NMR onderzoek over de fysiologische veranderingen in de urinesamenstelling. In hoofdstuk 6 worden de effecten op de samenstelling van diverse spieren gerapporteerd, voor wat betreft gehalten aan vet, eiwit en vocht. Tenslotte worden de resultaten bediscussieerd in hoofdstuk 7.

2 ZOÛTECHNISCH VERSLAG

2.1 Proefopzet

De dierproef bestond uit een voorperiode, dit was de periode gerekend vanaf aanvoer van de dieren op ons instituut tot aan het instellen van de proefbehandeling en een proefperiode, dit was de periode na het instellen van de proefbehandeling tot aan het slachten van de dieren.

De dieren waren ingedeeld in 8 behandelingsgroepen van elk 5 bokjes.

Groep 1: geen behandeling

Groep 2: behandeld met clenbuterol per os gedurende 4 weken (10 µg dag/kg l.g. in twee porties verstrekt)

Groep 3: behandeld met oestradiol gedurende 4 weken d.m.v. wekelijkse injecties met 2 mg 17 beta-oestradiolbenzoaat

Groep 4: behandeld met oestradiol gedurende 4 weken d.m.v. wekelijkse injecties en clenbuterol per os gedurende 4 weken (zie groep 2 en groep 3)

Groep 5: behandeld met testosteron gedurende 4 weken d.m.v. wekelijkse injecties met 20 mg testosteronpropionaat

Groep 6: behandeld met testosteron gedurende 4 weken d.m.v. wekelijkse injecties en clenbuterol per os gedurende 4 weken (zie groep 5 en groep 2)

Groep 7: behandeld met oestradiol en testosteron gedurende 4 weken d.m.v. wekelijkse injecties met 2 mg 17 beta-oestradiolbenzoaat/20 mg testosteronpropionaat

Groep 8: behandeld met oestradiol en testosteron gedurende 4 weken d.m.v. wekelijkse injecties en clenbuterol per os gedurende 4 weken (zie groep 7 en groep 2)

Schematisch voorgesteld kan het voorgaande als volgt worden weergegeven:

	Behandeling			
voer	geen	oest.	test.	oest./test.
-	+ (1)	+ (3)	+ (5)	+ (7)
clenb.	+ (2)	+ (4)	+ (6)	+ (8)

- = voer zonder clenbuterol

+ = behandeling (tussen haakjes nr. proefgroep)

Gebruikte preparaten voor de hormoonbehandeling

Oestradiolbenzoaat (2 mg/ml) in arachide olie + 10% benzylalcohol, code 04401 (IPnr. 17.075).

Testosteronpropionaat (20 mg/ml) in arachide olie + 10% benzylalcohol, code 04551 (IPnr. 17.074).

Oestradiolbenzoaat + testosteronpropionaat (resp. 2 mg/ml en 20 mg/ml) in arachisolie + 10% benzylalcohol, code 04551 (IPnr. 17.076).

Van deze preparaten kregen de desbetreffende dieren 1 ml per keer en werd intramusculair in de linker hals toegediend.

Genoemde preparaten waren welwillend ter beschikking gesteld door Intervet B.V. te Boxmeer (contactpersoon dr. J.C. Coert).

Gebruikte clenbuterol

Ventipulmin paard met de samenstelling van 0,016 mg clenbuterolhydrochloride per gram, chargenr. 90019.

De betreffende dieren kregen ongeveer 312,5 mg Ventipulmin/kg l.g. per keer voeren, dus 625 mg Ventipulmin/kg l.g. per dag. De te verstrekken hoeveelheid Ventipulmin werd wekelijks aangepast aan het gemiddelde gewicht van de 4 dieren van een hok. Het gehanteerde lichaamsgewicht was het bepaalde gewicht van de dieren aan het begin van de betreffende week plus de verwachte groei in 3,5 dag.

Ventipulmin was geleverd door Boehringer Ingelheim via Boehringer Ingelheim B.V. te Alkmaar.

Proefdieren

Voor deze proef werden 42 bokjes van het ras de Nederlandse Witte Geit aangekocht bij T. Geugjes te Marum. De keuze was op dit bedrijf gevallen omdat het een gezondheidscertificaat heeft en de verzorging van de dieren uitstekend is, terwijl er ook een goede administratie aanwezig is. De dieren

waren bij aanvoer 2 tot 6 dagen oud, zodat ze in ieder geval biest gedronken hadden en gewend waren aan de lambar. Bij aanvoer werden de dieren voorzien van plastic oormerken en werd het gewicht vastgesteld. Voor bijzonderheden van deze dieren voor wat betreft gewicht, leeftijd bij aanvoer, aanvoerdatum enz. zie ook bijlage 2, tabel 1.

Rantsoen en voeding

De dieren hadden de beschikking over kunstmelk via een lambar. De melk werd koud (d.w.z. op staltemperatuur) verstrekt in een concentratie van 150 g poeder/l melk. Tijdens de voorperiode hadden de dieren 24 uur en tijdens de proefperiode 19 uur de beschikking over deze melk, d.w.z. een ad libitum verstrekking. Daarnaast kregen ze vanaf een leeftijd van ca twee weken volop hooi. Vanaf een leeftijd van ca 4 weken kregen ze ad libitum kalverkorrel verstrekt. Vanaf ± deze leeftijd kregen de dieren ook de beschikking over volop schoon water.

De verstrekkingen van extra vitaminen en antibiotica, zowel curatief als profylactisch, worden in tabel 1 vermeld.

De samenstelling en de voederwaarde van het kunstmelkpoeder, de babykalverbrok en het hooi worden in tabel 2 vermeld.

Het kunstmelkpoeder was welwillend aan ons ter beschikking gesteld door Denkavit B.V. te Voorthuizen.

Vanaf één dag voor het instellen van de proefbehandeling tot aan het eind van de proef werd de lambar om 6.30 uur bij de dieren weggehaald.

De lambar werd om 9.30 uur teruggehangen. De dieren van de proefgroepen 2, 4, 6 en 8 (dit waren de dieren in de hokken 2, 4, 5, 7 en 9) kregen om 9.30 uur een zodanige hoeveelheid melk met clenbuterol verstrekt, dat om 15.30 uur deze hoeveelheid melk nagenoeg volledig geconsumeerd was. Om 15.30 uur werd aan deze dieren weer een zodanige hoeveelheid melk met clenbuterol gegeven, dat deze om 22.00 uur nagenoeg volledig geconsumeerd was. Om 22.00 uur kregen deze dieren een zodanige hoeveelheid melk zonder clenbuterol toegediend, dat er 's morgens om 6.30 uur nog een (kleine) restant aanwezig was. De dieren van de hokken 1, 3, 6, 8 en 10 (zonder clenbuterol) kregen om 9.30 uur en 15.30 uur een zodanige hoeveelheid melk, dat er om resp. 15.30 en 6.30 uur nog een (kleine) restant aanwezig was. Deze werkwijze werd gevolgd om een ad libitum opname te bewerkstelligen en er anderzijds toch zeker van te zijn, dat de verstrekte hoeveelheid clenbuterol geconsumeerd werd. 's Morgens werden de restanten van de melk teruggewogen en weggegooid.

Indeling proefgroepen

Het belangrijkste kenmerk bij de verdeling van de dieren over de proefgroepen was de leeftijd.

Daarnaast werd nog rekening gehouden met hun gewicht. Omdat maar een beperkt aantal dieren gelijktijdig geslacht kon worden en de geboortedata van de dieren relatief gezien ver uit elkaar lagen, startte de proef voor de dieren van de verschillende aanvoerdagen op verschillende dagen. Het gewicht

van de dieren werd één dag voor de verdeling over de proefgroepen vastgesteld. De aanvang van de proef voor de verschillende dieren (i.c. hokken) staat in tabel 1 vermeld. In concreto werden eerst groepen van 8 dieren gevormd op grond van hun leeftijd. Daarna werden deze 8 dieren zodanig verdeeld over 2 hokken (met en zonder clenbuterol) dat het gemiddelde gewicht en de spreiding hiervan voor de dieren over beide hokken zoveel mogelijk gelijk waren. De proefperiode begon voor de dieren van genoemde 2 hokken op dezelfde dag.

Huisvesting

In de periode vanaf aanvoer op het IVVO tot het begin van de proef verbleven de dieren in hokken van ca acht bokjes per hok op de voergang van de stierenstal. Na indeling werden ze gehuisvest in hokken van vier dieren in de stierenstal. Op elke indelingsdatum werd in één hok één dier van de proefgroepen 1, 3, 5 en 7 en in een ander hok één dier van de proefgroepen 2, 4, 6 en 8 geplaatst. De dieren welke clenbuterol verstrekt kregen, bevonden zich in de hokken 2, 4, 5, 7 en 9 (volgens loting bepaald). De overige dieren werden in de hokken 1, 3, 6, 8 en 10 gehuisvest. Tijdens de voorperiode en ook tijdens de proefperiode bevonden de dieren zich in ingestrooide ruimten. De eerste weken na aanvoer werden de dieren bijverwarmd met een biggenlamp. De dieren van de laatste aanvoerdatum waren zwak en zijn daarom ruim 4 weken bijverwarmd.

Tijdschema en diverse werkzaamheden

De dagen waarop de dieren gewogen, geïnjecteerd en geslacht werden staan in tabel 1 vermeld.

Het wegen van de dieren vond steeds voor het voeren tussen 9.00 en 9.15 uur plaats.

De bloedafname vond bij de betreffende dieren vlak voor het wegen plaats (9.00-9.15 uur). Dit gold ook voor alle dieren op hun slachtdatum.

Voor het verzamelen van de urine werden de dieren tussen 9.30 en ca 13.00 uur op een balanskooi gezet en als er dan nog geen urine was geproduceerd dan verbleef het dier tot 15.00 uur op deze kooi. Wanneer er dan nog niet geürineerd was dan werd de andere dag op dezelfde wijze urine verzameld.

De injectie met anabole stoffen vond steeds om 11.00 uur plaats op de betreffende dagen.

De clenbuterol werd verstrekt vanaf 's middags 15.30 uur op de dag van het begin van de proef (is ook de dag waarop de injecties met anabole stoffen toegediend zijn). De dieren kregen voor de laatste keer clenbuterol verstrekt op de ochtend van slachtdatum om 9.30 uur. Dus gedurende de proef van exact 28 dagen werd de clenbuterol in 56 keren toegediend.

De voerconsumptie en de groei werd bepaald vanaf één dag voor het instellen van de proefbehandelingen tot de daarop volgende maandag(en). Voor de gehele proefperiode was de gehele proefduur 29 dagen, d.w.z. één dag voor het instellen van de proefbehandeling tot en met de dag van slachten.

Het slachten van de dieren vond vanaf 10.00 uur plaats. De dieren werden verdoofd door elektrocutie en daarna verbloed. Binnen 5 minuten na het verbloeden werd de lever verwijderd. Na de lever werden de overige organen en weefsels verwijderd, gewogen, bemonsterd, gefixeerd in formaline of zo snel mogelijk in de diepvries geplaatst. De maximale tijdsinterval tussen verbloeden en plaatsing in diepvries bedroeg ca 1,5 uur. Om contaminatie bij het slachten uit te sluiten werden de dieren in een bepaalde volgorde geslacht nl. controle, E, T en E/T. De met clenbuterol behandelde dieren werden het laatst geslacht. Voor de gebezigde volgorde zie tabel 3.

Waarnemingen

- De gezondheidstoestand werd minimaal tweemaal per dag bekeken en afwijkingen van het normale beeld werden genoteerd.
- De dieren werden gewogen op de tijdstippen vermeld in tabel 1.
- De melkpoeder werd dagelijks afgewogen en de verstrekte hoeveelheid hooi en krachtvoer wekelijks. De geconsumeerde hoeveelheden werden resp. dagelijks en wekelijks per hok van 4 dieren berekend en genoteerd.
- Van het verstrekte voer (kunstmelkpoeder, kalverkorrel en hooi) werd éénmaal bij het begin van de proef een monster genomen. Bij het klaarzetten van de clenbuterolpremix voor de diverse hokken werd steeds (wekelijks) een (verzamel)monsters genomen.
- De bloedmonstername vond op de in tabel 1 genoemde tijdstippen plaats.
- De monstername van de urine vond op de in tabel 1 genoemde tijdstippen plaats.
- Bij het slachten werd naar eventuele pathologische afwijkingen gekeken.

In tabel 3 worden de werkzaamheden vermeld die bij het slachten uitgevoerd zijn. Tevens wordt een overzicht gegeven van het materiaal dat tijdens de proef bij het slachten verzameld is.

In tabel 4 wordt een overzicht gegeven van de onderzoeken welke in het verzamelde materiaal uitgevoerd gaan worden.

2.2 Resultaten

Gezondheidstoestand

Tijdens de voorperiode (2-3 weken na aanvoer) was de gezondheidstoestand van de laatste aangevoerde dieren duidelijk minder. De eetlust was maar matig, diarree, soms verhoging van lichaamstemperatuur. Tijdens deze periode zijn er ook 3 dieren gestorven. Daarna was de gezondheidstoestand tijdens de voorperiode, een uitzondering daargelaten, uitstekend (sepsis: zie ook tabel 1). De uitzondering was het hoesten van een aantal dieren 4 weken na aanvoer.

De gezondheidstoestand van de dieren tijdens de proefperiode was uitstekend, behalve dier 41 die daags nadat de proef begonnen was, stierf. Het dier had een hoge lichaamstemperatuur ($> 42^{\circ}\text{C}$), maar bij sectie kon geen duidelijke doodsoorzaak vastgesteld worden (zie sectierapport van een onzer). Wel week het bloedbeeld van het bloed genomen daags voor het overlijden af van de overige dieren (zie tabel 11).

Voederopname, gewichtsverloop en groei

In de tabellen 5 t/m 10 worden de voeropname, gewichten en de groei van de dieren per hok en per proefbehandeling weergegeven. Omdat er een duidelijk hokeffect is op de opname van het soort voer en daardoor op de groei wordt daarom ook steeds het hokgemiddelde vermeld. De dieren van het ene hok namen meer melk op dan die van het andere hok, terwijl de dieren van het andere hok daarentegen weer meer hooi en/of korrels opnamen.

Om de voeropname toch onder één noemer te brengen wordt de voeropname in de tabellen 5 en 6 ook omgerekend in energie-opname (VEVI= voedereenheid vleesvee intensief). Ondanks het feit dat dieren in bepaalde hokken meer kalverkorrel en/of hooi opnamen leidde dit niet tot een zelfde totale energie-opname als die van de dieren van de hokken die meer melk dronken. Dit komt omdat de energiedichtheid van kunstmelkpoeder aanzienlijk hoger is dan van de beide andere voedermiddelen. Ondanks het feit dat de dieren van de proefbehandelingen over de verschillende hokken verdeeld waren, was de gemiddelde voeropname van de dieren die eenzelfde proefbehandeling hadden ondergaan niet hetzelfde, ofschoon de verschillen tussen de proefbehandelingen kleiner waren dan de verschillen tussen de hokgemiddelden.

Omdat de individuele voeropnamen niet bekend zijn heeft het weinig zin de voederbenutting (kg voer/kg groei) uit te rekenen.

In tabel 7 wordt ook de opname aan clenbuterol weergegeven. Uit de hier vermelde gegevens blijkt, dat het goed gelukt is de hoeveelheid van gemiddeld $10 \mu\text{g/kg}$ lichaamsgewicht toe te dienen, zij het dat, door het houden en voeren van de dieren in groepen van 4, individueel verschillen in opgenomen hoeveelheid clenbuterol wel zullen zijn opgetreden. De grootste afwijking vond in de eerste week voor hok 9 plaats, omdat een dier uit dit hok gestorven was. De kleine afwijkingen die tijdens de proef plaatsvonden konden geheel toegeschreven worden aan het verschil tussen verwachte groei en werkelijke groei.

Globaal kan gesteld worden dat een behandeling met anabole stoffen de groei iets verbeterd heeft. De verschillen in groei en energie-opname tussen de groepen dieren die met anabole stoffen behandeld waren, zijn zeer klein (zie tabel 10), terwijl de groei van de dieren die clenbuterol kregen iets achterbleef bij die van de dieren die geen clenbuterol kregen. Dit verschijnsel is ook bij andere diersoorten bekend, vooral bij ad libitum voeding. De effecten van clenbuterol komen vooral tot

uitdrukking in een grotere eiwitaanzet en mindere aanzet van vet. Dit ziet men aan een betere benutting van het voer en een betere kwaliteit van het karkas (meer vlees, minder vet; zie later). De betere voederbenutting kon bij onze proef niet vastgesteld worden.

Bloedkarakteristieken

In tabel 4 is aangegeven welke bloedparameters onderzocht zijn en in tabel 1 staat vermeld op welke tijdstippen de betreffende monsters genomen zijn. In de tabellen 11 en 12 worden de waarden per dier en per proefbehandeling weergegeven. Uit deze cijfers valt de grote spreiding op van met name ALP, cholesterol en LDH. Vergelijking van deze cijfers met de referentiewaarden zoals deze door de Gezondheidsdienst gehanteerd worden leert ons, dat met name de ALP-waarden en soms de LDH waarden van ons onderzoek vaak (soms) veel hoger liggen. Daarnaast zijn er bepalingen uitgevoerd waarvan (nog) geen referentiewaarden bekend zijn. De referentiewaarden van de GD zijn gebaseerd op een onderzoek van 4x25 vrouwelijke volwassen geiten in augustus 1984. Onze geitjes zijn mannelijk, veel jonger en ons onderzoek vond meest in de maand april plaats.

Er zijn geen duidelijke systematische verschillen tussen de proefbehandelingen te zien.

Gewichten van organen en weefsels

In tabel 13 worden de gewichten van organen en weefsels per dier weergegeven. Om de gewichten van de organen ook beter met elkaar te kunnen vergelijken zijn ze ook relatief (t.o.v. levend gewicht op de dag van slachten) weergegeven. De grote spreiding in de, ook relatieve, gewichten van nierbekkenvet, thymus, pancreas, parotis, testikel en de bulboërethraalklier vallen op. In de tabellen 14 t/m 17 worden de gemiddelden van de gewichten per hok en per proefbehandeling weergegeven. De gewichten van de spieren zijn bij de met clenbuterol behandelde dieren hoger (zie ook tabel 16), de gewichten van nierbekkenvet en lever daarentegen wat lager bij de clenbuterol dieren. Of de verschillen in gewichten bij pancreas en parotis significant zijn is niet erg waarschijnlijk gezien de grote spreiding. De verschillen m.b.t. de behandeling met anabole stoffen zijn niet erg eenduidig. De gewichten van thymus en testikel van de E/T groep lijken wat lager dan die van de andere groepen.

2.3 Conclusie

De dierproef had een onverstoord verloop. De gezondheidstoestand van de dieren was tijdens de proef uitstekend, behalve één dier dat één dag na het instellen van de proefbehandelingen gestorven was.

De groei van de dieren was erg hoog, maar dit is mede veroorzaakt door de ad lib. verstrekking van kunstmelk. Kunstmelk is een zeer energierijk voer dat door de dieren graag geconsumeerd wordt.

Ondanks het feit dat er een zeer groot aantal waarnemingen gedaan moesten worden en ook veel divers materiaal verzameld moest worden is de proef geheel volgens plan (protocol) uitgevoerd. Er ontbreken nagenoeg geen gegevens, een enkele keer was een klier of orgaan iets aangesneden, zodat deze niet gewogen kon worden.

De verschillen in groei tussen de verschillende proefbehandelingen waren i.h.a. niet groot. Wel kan de conclusie getrokken worden dat de clenbuterol dieren duidelijk meer spier (vlees) en minder vet gevormd hebben. De met anabole stoffen behandelde dieren tenderden naar een wat snellere groei en iets zwaardere spieren.

De verschillen m.b.t. de bloedkarakteristieken waren niet groot en wezen niet eenduidig naar een bepaalde proefbehandeling, zelfs niet voor ureum- en lipidengehalten. Deze laatste zouden naar verwachting wel beïnvloed moeten zijn (anabolic en repartitioning agents).

De variatie in gewichten van verschillende organen was groot, behalve die van hart en nier. Ook hier waren er weinig systematische verschillen. Alleen de gewichten van de thymus en testikels van de dieren van de E/T groep waren wat lager dan die van de overige groepen. Clenbuterol lijkt in deze geen grote invloed gehad te hebben.

3 HET HISTOLOGISCH ONDERZOEK

3.1 Inleiding

Het histologisch onderzoek heeft zich in eerste instantie gericht op de prostaat omdat dit orgaan al gebruikt wordt voor de screening op gebruik van hormonen bij vleeskaiveren.

Na de eerste veelbelovende resultaten in de prostaat en de lever is veel aandacht besteed aan de identificatie van de aard van de door clenbuterol veroorzaakte veranderingen. Hierdoor is op sommige punten minder aandacht aan andere orgaansystemen besteed dan oorspronkelijk was gepland.

Na de prostaat en de lever is de rest van het geslachtsapparaat bekeken en daarna de overige organen.

3.2 Materiaal en methoden

Bij het slachten is gelet op macroscopische veranderingen aan het karkas en de organen.

Zo snel mogelijk na het doodmaken is de lever verwijderd, schoongeprepareerd, gewogen en gespoeld met fysiologisch zout. Dan is een stukje van de lobus caudatus afgeprepareerd en in twee stukjes verdeeld, waarvan er één gefixeerd werd in formaline en het andere stukje ingevroren in met vloeibare stikstof gekoelde isopentaan en bewaard bij - 70° C.

Na de lever zijn van de volgende organen monsters genomen en op overeenkomstige wijze gefixeerd: Prostaat, zaadblaas, bulbourethraalklier, testis, epididymis, bijnier, nier, schildklier, pancreas, thymus, long, hart, spier, parotis (speekselklier), niervet en subcutaan vet. De hypofyse werd gefixeerd in Bouin.

Na fixatie zijn de organen ingebed in paraffine en zijn er coupes van 5 μ m gesneden.

Alle organen zijn standaard gekleurd met haematoxyline-eosine vlg. Mayer. Daarnaast is bij de meeste organen de Weigert van Gieson kleuring gedaan voor bindweefsel, en de Alcian Blauw PAS voor mucines.

De lever is tevens gekleurd met PAS, diastase PAS, koperkleuring (DMABR), ijzerkleuring (PPB), galkleuring (Fouchet), Masson Trichroom, Ca-lipase voor triglyceriden, Oil Red O voor vet, lipase Tween voor lipases, BHL voor bilirubine, haemosiderine en lipofuscine en diverse eiwitkleuringen.

Op de prostaat zijn nog extra mucinekleuringen uitgevoerd zoals de HID-AB en de LID-AB. Verder zijn er diverse immunohistochemische kleuringen uitgevoerd met antilichamen tegen specifieke cytokeratines, hormoonreceptoren voor oestradiol, progesteron en testosteron.

Ook bij de pancreas zijn extra kleuringen uitgevoerd, nl. DMAB (tryptofaan), GAFT (kleurt α , β en δ cellen in de eilandjes van Langerhans), en immunochemisch is gekleurd op insuline, glucagon en somatostatine.

3.3 Resultaten

Macroscopie

Bij geen van de dieren is bij het slachten iets bijzonders opgevallen, de dieren leken gezond en in goede conditie.

Histologie

PROSTAAT

Groep 1: De prostaten van de controledieren vertoonden het normale beeld voor hun leeftijd.

Groep 2: De met clenbuterol behandelde dieren vertoonden vacuolisatie van het apicale epitheel van de urethra en kernveranderingen in het urethraepitheel zoals kernfragmentatie en pyknose. Het klierweefsel vertoonde degeneratieve veranderingen die varieerden van vacuolisatie van het epitheel tot complete necrose van klieracini. Daarnaast werd fibromusculaire hypertrofie waargenomen.

Groep 3: Van de met oestradiol behandelde dieren vertoonden 4 van de 5 metaplastische woekeringen in het klierweefsel, de urethra was verdikt en vertoonde soms vacuolisatie en keratinisatie. Fibromusculaire hypertrofie werd bij alle dieren waargenomen.

Groep 4: De (E2 + clen) dieren vertoonden zowel metaplasie, en dit soms meer uitgesproken dan in groep 3, als degeneratie, met name vacuolisatie van het klierepitheel. Daarnaast fibromusculaire hypertrofie.

Groep 5: Deze dieren vertoonden soms verdikt urethra-epitheel, soms vacuolisatie en kernfragmentatie en pyknose. Het klierweefsel was wat hyperplastisch en vertoonde bij enkele dieren een duidelijk toegenomen secretie met verwijde tubuli. Daarnaast fibromusculaire hypertrofie.

Groep 6: Deze dieren vertoonden opvallende degeneratie van het urethra-epitheel met kernfragmentatie en pyknose. Secretie was minder uitgesproken dan in groep 5. In het klierweefsel werd ook wat degeneratie gezien, met vacuolisatie en pyknose. Daarnaast fibromusculaire hypertrofie.

Groep 7: Deze dieren vertoonden een verdikte urethra met vacuolisatie. Het klierweefsel vertoonde hyperplasie en metaplasie, daarna was duidelijke fibromusculaire hypertrofie waarneembaar.

Groep 8: Bij deze dieren vertoonde het urethra-epitheel uitgebreide kernfragmentatie en pyknose. Het klierweefsel vertoonde verwijde tubuli en toegenomen secretie. Bij 3 van de 4 dieren werd wat metaplasie waargenomen, terwijl het 4e dier uitgebreide metaplasie vertoonde. In alle coupes was uitgebreide fibromusculaire hyperplasie waarneembaar.

De meest opvallende histologische afwijkingen zijn schematisch weergegeven in bijlage 3, figuren 1 en 2.

De overige toegepaste kleuringen leverden geen aanvullende informatie. M.b.t. de hormoonreceptoren konden geen duidelijke verschillen tussen de groepen worden waargenomen. Ook de cytokeratinekleuringen leverden geen nieuwe resultaten. Evenals bij het kalf kon metaplasie goed worden aangekleurd.

De heldere vacuolen zoals waargenomen in het klierweefsel van met clenbuterol of met combinaties met clenbuterol behandelde dieren, konden met geen van de mucinekleuringen worden geïdentificeerd, terwijl ook de vetkleuringen negatief waren.

ZAADBLAAS

Het meest opvallende bij alle met clenbuterol behandelde groepen (groep 2, 4, 6 en 8) was uitgesproken fibromusculaire hypertrofie. De met hormonen behandelde dieren vertoonden wat toegenomen secretie en soms wat hyperplasie. Heldere vacuolen werden bij alle groepen waargenomen.

BULBOURETHRAALKLIER

Groep 1: normaalbeeld

Groep 2: wat schuimig cytoplasma, wat degeneratie, pyknose, fibromusculaire hypertrofie.

Groep 3: verwijde tubuli en toegenomen secretie, hyperplasie, sterke metaplasie, fibromusculaire hypertrofie.

Groep 4: degeneratie met wat pyknose, metaplasie, heldere vacuolen, sterke fibromusculaire hypertrofie.

Groep 5: sterk verwijde tubuli en sterke secretie, fibromusculaire hypertrofie.

Groep 6: degeneratie en sterke fibromusculaire hypertrofie.

Groep 7: degeneratie, sterke hyperplasie, metaplasie, sterke fibromusculaire hypertrofie.

Groep 8: sterke degeneratie, sterk schuimig cytoplasma, wat hyperplasie, wat metaplasie, veel heldere vacuolen en zeer sterke fibromusculaire hypertrofie.

EPIDIDYMIS

De behandelde groepen vertoonden wat degeneratie van het epitheel, verder weinig consistente veranderingen.

TESTIS

Groep 1: diverse stadia van spermatogenese, normaalbeeld.

Groep 2: wat minder ontwikkeling, degeneratie van Leydig cellen.

Groep 3: diverse stadia van ontwikkeling, degeneratie kiemcellen, celklontering en lumenvorming.

Groep 4: diverse stadia van ontwikkeling, sterke degeneratie spermatocyten, weinig Leydig cellen, iets fibrose.

Groep 5: wat minder ontwikkeling, veel fibrillair materiaal, lumenvorming, degeneratie kiemcellen, weinig Leydig cellen.

Groep 6: redelijke ontwikkeling, lumenvorming, wat degeneratie, veel fibrillair materiaal, weinig Leydig cellen.

Groep 7: geringe ontwikkeling, degeneratie kiemcellen, veel interstitium, weinig Leydig cellen.

Groep 8: diverse stadia van ontwikkeling, degeneratie, celklontering, wat fibrose, weinig Leydig cellen.

LEVER

Groep 1: plaatselijk kleine lymfocyttaire infiltraten periportaal, plaatselijk kleine ontstekingshaardjes verspreid door de leverlobjes.

Groep 2: als 1, tevens activatie van Kupffercellen diffuus door het leverlobje, de hepatocyten waren onregelmatig van vorm en vertoonden toegenomen hoeveelheid aangekleurd koper vergeleken met de controles. Toegenomen activiteit endogene peroxidases. Iets fibrose.

Groep 3: als 1, tevens wat fibrose.

Groep 4: als 1, tevens activatie Kupffercellen, toegenomen hoeveelheid aangekleurd koper en endogene peroxidases. Wat galgang proliferatie, en single cell necrose. Wat fibrose.

Groep 5: als 1, tevens wat fibrose.

Groep 6: als 1, tevens toegenomen hoeveelheid aangekleurd koper, toegenomen peroxidase activiteit, activatie Kupffercellen, wat galgang proliferatie, single cell necrose. Wat fibrose.

Groep 7: als 1, wat fibrose.

Groep 8: als 1, tevens toegenomen hoeveelheid aangekleurd koper, toegenomen peroxidase activiteit, activatie Kupffercellen, wat galgang proliferatie, single cell necrose. Wat fibrose.

BIJNIER

Geen opvallende verschillen tussen de diergroepen, de behandelde dieren vertoonden wat fibrose in het merg. De zona glomerulosa kleurde wat basofieler bij groepen 4,5,6,7 en 8. De zona arcuata zag er wat gaterig uit bij de behandelde dieren.

NIER

Weinig verschillen tussen de groepen, wat meer degeneratie bij de met clenbuterol behandelde diergroepen.

SCHILDKLIJER

Geen duidelijke verschillen tussen de groepen.

PANCREAS

Groep 1: normaalbeeld

Groep 2: plaatselijk degeneratie in het exocriene deel. Sterkere aankleuring insuline.

Groep 3: epitheelproliferatie in de eilandjes van Langerhans. Sterkere aankleuring glucagon.

Groep 4: epitheelproliferatie in de eilandjes van Langerhans. Sterke degeneratie exocriene pancreas.

Minder aankleuring glucagon, sterkere aankleuring tryptofaan.

Groep 5: epitheelproliferatie in de eilandjes van Langerhans.

Groep 6: veel eilandjes, degeneratie exocriene pancreas, bloedrijke eilandjes, sterkere aankleuring insuline.

Groep 7: bloedrijke eilandjes, epitheelproliferatie in de eilandjes van Langerhans.

Groep 8: bloedrijke eilandjes, epitheelproliferatie in de eilandjes van Langerhans.

THYMUS

Groep 1: normaalbeeld

Groep 2: centraal in merg eosinofiele leucocyten (eo's), wat vervet, wat fibrose.

Groep 3: als 1.

Groep 4: enkele wat vervet, enkele met centraal wat eo's.

Groep 5: vervet, plaatselijk ontsteking Hassall lichaampjes, wat vervet.

Groep 6: fibrose

Groep 7: fibrose, ontsteking Hassall lichaampjes, wat vervet.

Groep 8: fibrose, vervet, plaatselijk eo's

LONG

Geen opvallende verschillen tussen de groepen.

SPIER

Geen opvallende verschillen tussen de groepen.

HART

Geen opvallende verschillen tussen de groepen.

NIERVET

Geen opvallende verschillen tussen de groepen.

SUBCUTAAN VET

Geen opvallende verschillen tussen de groepen.

MILT

Geen opvallende verschillen tussen de groepen.

PAROTIS

Geen opvallende verschillen tussen de groepen.

HYPOFYSE

Geen opvallende verschillen tussen de groepen, met de tot nu toe uitgevoerde kleuringen.

3.4 Discussie

De opvallendste afwijkingen waren te zien aan de prostaat, bulbourethraalklier, testis en lever.

Bij de met clenbuterol behandelde dieren werden voornamelijk degeneratieve veranderingen waargenomen. Oestradiol veroorzaakte in de prostaat, zaadblaas, bulbourethraalklier en pancreas ook proliferatieve veranderingen. De in de geslachtsorganen waargenomen veranderingen zijn in overeenstemming met de in de literatuur beschreven veranderingen bij vleeskalveren (Groot, 1990; Kroes, 1970; Kroes e.a., 1976; Groot & Arts, 1991). Testosteron gaf degeneratieve veranderingen aan de geslachtsorganen, zoals ook beschreven voor vleeskalveren (Groot, 1992).

Bij gecombineerd gebruik van clenbuterol en oestradiol werden karakteristieken van beide componenten aangetroffen. Bij gecombineerd gebruik van clenbuterol en testosteron leken de degeneratieve veranderingen duidelijker. Bij gebruik van oestradiol, testosteron en clenbuterol waren soms de karakteristieken van alledrie componenten waarneembaar, maar niet altijd.

De door clenbuterol veroorzaakte veranderingen aan de prostaat zijn in de literatuur niet eerder beschreven. Degeneratieve effecten van beta-agonisten in het algemeen zijn weinig bekend. Dit zal veroorzaakt worden door het symptoomloos verloop en de goede groei die er mee samen gaat. Waarschijnlijk worden de dieren geslacht voordat er klinische verschijnselen gaan optreden.

In dierproeven gericht op effecten op karkassamenstelling en groeieffecten, wordt histologisch onderzoek in de regel niet uitgevoerd als dieren geen klinische verschijnselen vertonen (Muir e.a., 1985; Quirke e.a., 1988; Ricks e.a., 1964).

De door clenbuterol veroorzaakte veranderingen treden op in het epitheel en in het stroma. Het epitheel vertoont achtereenvolgens cytoplasmatische vacuolisatie en celdood. Het necrotische weefsel ligt schijnbaar zonder ontstekingsreactie op te wekken tussen nog levend weefsel. De stroma veranderingen bestaan uit fibromusculaire hypertrofie en fibrose. De musculaire hypertrofie zal een gevolg zijn van de herverdelende werking, terwijl de fibrose waarschijnlijk een reactie is op epitheliale degeneratie.

Mogelijk gebruik van deze effecten is histologische screening op gebruik van clenbuterol door onderzoek van de prostaat. Uit recent onderzoek is gebleken dat ook bij kalveren overeenkomstige veranderingen worden geïnduceerd, zij het dat de degeneratie veelal niet verder gaat dan vacuolisatie van het perifere klierepitheel (Groot, 1992).

Groot voordeel hierbij is dat in dezelfde coupe zowel effecten van clenbuterol als oestrogenen waarneembaar kunnen zijn. Dit betekent dat voor simultane screening op beta-agonisten en hormonen geen extra handelingen hoeven te worden verricht, zodat er ook geen extra kosten gemaakt hoeven te worden.

Enige voorzichtigheid bij de interpretatie is echter geboden, aangezien niet bekend is of ook andere stoffen soortgelijke effecten kunnen opwekken. Er is dus altijd vervolgonderzoek nodig in de vorm van een chemische residu analyse in urine of lever, of voor onderzoek in de mestfase. Verdachte mesters kunnen zo worden opgespoord.

Wat betreft de waargenomen veranderingen in de overige geslachtorganen kan worden opgemerkt dat de bulbourethraalklier wat betreft oestrogenen een soortgelijke reactie vertoont als de prostaat, terwijl bij gebruik van clenbuterol overeenkomstige degeneratie gezien kon worden, vacuolisatie was echter minder duidelijk. Bij de testis was er nauwelijks onderscheid te maken tussen de diverse behandelingsgroepen, aangezien degeneratie bij elk van de gebruikte stoffen het opvallendste kenmerk was.

De levers van de met clenbuterol behandelde bokjes vertoonden activatie van Kupffercellen, iets fibrose en toegenomen hoeveelheid aangekleurd koper en endogeen peroxidase. Bij dieren die tevens met oestradiol en/of testosteron waren behandeld was tevens galgangproliferatie en single cell necrose aanwezig.

Toxische effecten van clenbuterol in de lever zouden veroorzaakt kunnen zijn door een verhoogde peroxidase activiteit (Groot, 1992). Peroxidases vertonen affiniteit voor fenol en aldehyd groepen zoals deze bij beta-agonisten voorkomen (Martindale, 1989). Blootstelling aan deze stoffen zou kunnen leiden tot inductie van oxidatieve enzymen (Pruyn, 1990). Gedurende de oxidatieve reacties worden radicalen gevormd, welke kunnen leiden tot celbeschadigingen (Pruyn, 1990).

De sterkere aankleuring van koper kan een gevolg zijn van inductie van koperbevattende enzymen of van een verminderde uitscheidingscapaciteit van de lever.

Van anabole steroïden is bekend dat zij kunnen leiden tot vermindering van de uitscheidingscapaciteit van de lever en geelzucht kunnen veroorzaken (Krüskemper, 1968; Noller & Fish, 1974).

Het is echter ook mogelijk dat door een verhoogd metabolisme verhoogde aanvoer van bloed van het maagdarmkanaal. De lever krijgt op deze manier een groter aanbod aan eventuele toxische milieu-componenten en microorganismen, wat tot dezelfde histologische beelden kan leiden.

De pancreas vertoonde afwijkingen bij de diverse behandelingsgroepen, maar er was binnen deze groepen veel variatie. Clenbuterol gaf vacuolaire degeneratie te zien van de exocriene pancreas, echter niet bij alle dieren. Immunohistochemisch kleurde insuline sterker aan dan bij de controle dieren. Werd clenbuterol echter gecombineerd met oestradiol of testosteron dan was dit niet meer waarneembaar. Met oestradiol behandelde dieren vertoonden epitheelproliferaties in de eilandjes van Langerhans en een sterkere aankleuring van glucagon. Werd oestradiol gecombineerd met testosteron of clenbuterol dan was de glucagonkleuring vergelijkbaar met de controledieren.

Somatostatine aankleuring was bij alle groepen gelijk.

De thymus vertoonde bij de met clenbuterol behandelde dieren wat vervetting en wat fibrose. Er was echter vrij veel variatie binnen de groep. De dieren die behandeld waren met combinaties van clenbuterol met oestradiol en/of testosteron vertoonden ook fibrose en de meesten waren iets vervet. Vervetting kan een vorm van degeneratie zijn waarbij thymusweefsel wordt vervangen door vet. Fibrose kan een reactie op degeneratie zijn.

Concluderend kan gesteld worden dat clenbuterol degeneratieve veranderingen veroorzaakt in het geslachtsapparaat, de lever, de pancreas en de thymus. De anabole steroïden oestradiol en testosteron werken vooral in op de geslachtsorganen en in mindere mate op de lever.

Door clenbuterol veroorzaakte veranderingen in de prostaat kunnen eventueel gebruikt worden voor screening naar illegaal gebruik van deze stof.

4 DE GEHALTEN CLENBUTEROL, 17 β -OESTRADIOL EN 17 β -TESTOSTERON IN URINE EN PLASMA

4.1 Materiaal en methoden

Voor het bepalen van de gehalten aan clenbuterol 17 β -oestradiol en 17 β -testosteron in urine en plasma werden immunochemische analysetechnieken gebruikt. De gehalten van deze stoffen worden vergeleken met bij het mannelijke stierkalf bekende waarden.

De resultaten zijn statistisch verwerkt via variantie-analyse om na te gaan in hoeverre de verschillende behandelingen een invloed op elkaar zouden uitoefenen. Door het toch geringe aantal dieren is het onderscheidend vermogen van de toetsen echter niet zeer groot. Aangezien een aantal waarnemingen lager dan de detectiegrens van de gebruikte analysemethode ligt, is een aantal aannamen gemaakt t.b.v. de statistische verwerking. Voor een samenvatting van de proefopzet wordt verwezen naar hoofdstuk 2.

Monstermaterialen

Voor het onderzoek naar gehalten van clenbuterol, 17 β -oestradiol en 17 β -testosteron zijn van alle proefdieren bloed (plasma)- en urinemonsters genomen op de slachtdatum. Regelmatig zijn tijdens de proef van 12 dieren bloed- en urinemonsters genomen (3 controledieren, 3 dieren behandeld met E2+T, 3 dieren behandeld met Cb en 3 dieren behandeld met E2+T+Cb). Omdat één dier uit de groep behandeld met E2+T+Cb stierf één dag na het instellen van de proefbehandeling is dit dier vervangen door één dier uit de groep behandeld met T+Cb.

4.2 Analysemethoden

4.2.1 Enzymimmunoassay voor clenbuterol

In RIKILT-DLO rapport 90.51 is een uitgebreide omschrijving van de multi-enzymimmunoassay (EIA) voor de bepaling van clenbuterol gegeven. Deze methode is opgezet voor de bepaling van clenbuterol en andere beta-agonisten in urinemonsters van runderen. De monstervoorbewerking is minimaal; uitgaande van 10 μ l van een urinemonster (op pH 7 gebracht en gecentrifugeerd bij 2300 g) en direct geanalyseerd bedraagt het meetbereik 0,5 tot 25 ng/ml. Zoals beschreven in RIKILT-DLO rapport 91.18 worden met deze directe screeningsmethode, in vergelijking met de GC-MS methode, 2 - 3 maal hogere clenbuterolgehalten in urine monsters van behandelde kalveren gevonden. Hierbij werd ervan uitgegaan dat metabolieten van clenbuterol, waarvoor de gebruikte antilichamen kruisreactiviteit vertonen, verantwoordelijk waren voor het vinden van de hogere gehalten.

Voor het bepalen van clenbuterol in bloedplasma werd dezelfde procedure toegepast (zonder monstervoorbewerking) uitgaande van monstervolumina van 10 en 50 μ l plasma. Aan 1 ml plasma werd 0,5 ml boraatbuffer (0,1 M di-natrium-tetraboraat, met HCl op pH 8,0 gebracht) en 4 ml tertiair-butyl,methyl ether (TBME) toegevoegd. Na 30 seconden schudden werd 2 ml van de TBME-fractie afgepipetteerd en ingedampt onder stikstof. Het residu werd opgenomen in 200 μ l PBS-Tween, waarvan 50 μ l met de EIA werd onderzocht.

4.2.2 RIA voor 17β -oestradiol en 17β -testosteron

Voor het bepalen van 17β -oestradiol en 17β -testosteron werden commercieel verkrijgbare Radio Immuno Assays (RIA; COAT-A-COUNT Total testosterone en oestradiol van Diagnostic Products Corporation (DPC)) gebruikt.

Bij deze vaste fase radioimmunoassay worden met antilichamen gecoate buizen en met ^{125}I gelabeld testosteron en oestradiol gebruikt. De gelabelde steroïden gaan competitie aan met de in het monster aanwezige steroïden om het aantal bindingsplaatsen van de antilichamen. Door decanteren worden de aan de antilichamen gebonden steroïden gescheiden van de nog in oplossing zijnde steroïden. De hoeveelheid van de aan de antilichamen gebonden gelabelde verbinding is omgekeerd evenredig met de concentratie van de verbinding in het monster.

De methoden zijn ontwikkeld voor de directe bepaling van 17β -oestradiol en 17β -testosteron in humane serum- of plasmamonsters. Voor 17β -testosteron is het meetbereik 0,2 tot 16 ng/ml (bij 50 μ l monster in de test) en voor 17β -oestradiol 0,02 tot 3,6 ng/ml (bij 100 μ l monster in de test).

In urine zijn de steroïdhormonen voor het merendeel aanwezig als glucuronide- en/of sulfaatconjugaaten. Tijdens de analyse worden deze enzymatisch gehydrolyseerd waarbij gebruik wordt gemaakt van Helix Pomatia. In het kort kan de gebruikte opwerkingsprocedure als volgt worden omschreven.

Aan 0,5 ml urine wordt ^3H gelabeld 17β -oestradiol of 17β -testosteron (ca. 50000 desintegraties per minuut/25 μl) als interne standaard toegevoegd. Daarna wordt 3 ml acetaatbuffer (0,15 M; pH 4,5) en 20 μl Helix Pomatia toegevoegd en gedurende 2 uur bij 50°C geïncubeerd. Het gehydrolyseerde monster wordt vervolgens over een geactiveerde C18-kolom gebracht. De kolom wordt gewassen met achtereenvolgens 2,5 ml aceton/water (20/80; v/v) en 2,5 ml methanol/water (50/50; v/v) [Arts et al, 1989]. De steroïden worden geëluëerd met 2 ml methanol, het eluaat wordt drooggedampt en het residu opgenomen in 25 μl methanol, waaraan 475 μl PBS wordt toegevoegd. Van deze oplossing wordt 25 μl gebruikt voor de bepaling van de hoeveelheid aan getritieerde verbindingen (recovery-bepaling met de beta-teller) en 50 μl wordt gebruikt voor de bepaling van de hoeveelheid 17β -oestradiol en 17β -testosteron.

Bij de immunoassays is de kruisactiviteit van de te gebruiken antisera voor met name andere van nature voorkomende stoffen een belangrijk factor. Het antiserum tegen E2 is door de fabrikant getest op de kruisreactiviteit voor diverse stoffen. Voor de meeste van nature voorkomende steroïden (zoals de geglycuronideerde verbindingen van β -oestradiol en α -oestradiol) is de kruisreactiviteit kleiner dan 1 %. Alleen voor estron wordt een kruisreactiviteit gevonden van 1,1 %. Voor het exogene hormoon ethinyloestradiol wordt een kruisreactiviteit van 1,8% gevonden.

De kruisreactiviteit van het antiserum tegen T wordt weergegeven in Tabel I.

Tabel I: opgegeven kruisreactiviteit van anti-T met steroïden

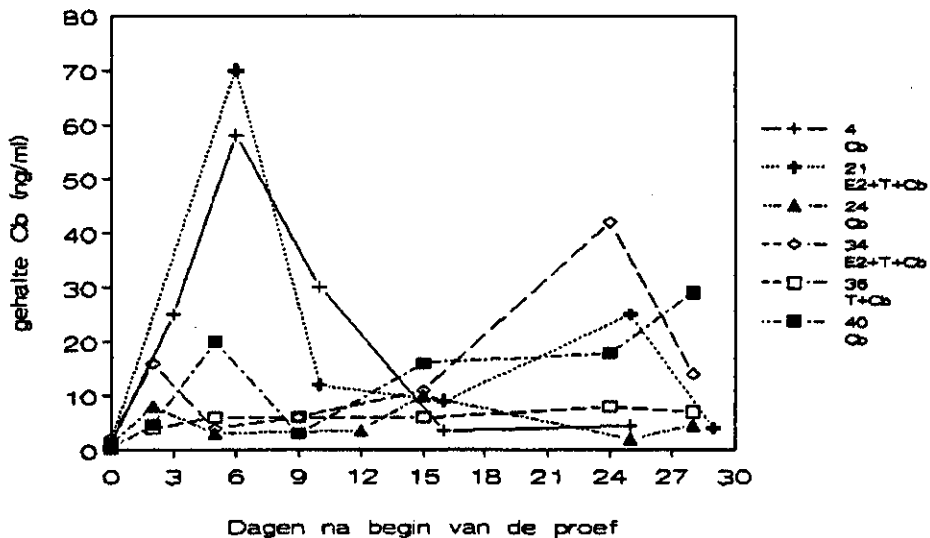
verbinding	% kruisreactiviteit
5 α -dihydrotestosteron	3,2
4-estren-7 α -methyl-17 β -ol-3-on	1,1
4-estren-17-ol-3-on	20
19-nortestosteron	21
19-hydroxyandrosteendion	2,0
11-ketotestosteron	16
methyltestosteron	1,7
11 β -hydroxytestosteron	1,2

4.3 Resultaten en discussie

4.3.1 Clenbuterol in urine

De clenbuterolgehalten gevonden in alle urinemonsters staan weergegeven in bijlage 4.

In Figuur 1 worden de clenbuterolgehalten gevonden in tijdens de proef genomen urinemonsters van zes met clenbuterol behandelde bokjes, uitgezet tegen het aantal proefdagen.



Figuur 1: Clenbuterolgehalten (ng/ml) in urinemonsters van behandelde bokjes.

Bij drie dieren werd een maximaal clenbuterolgehalte (20 tot 70 ng/ml) gevonden na vijf dagen behandelen. Bij de twee dieren behandeld met de combinatie clenbuterol + 17β -testosteron + 17β -oestradiol werd een tweede maximum gevonden na 24/25 dagen behandelen. De urinemonsters van twee dieren, één behandeld met alleen clenbuterol en één behandeld met de combinatie clenbuterol en 17β -testosteron, vertoonden relatief constante en lage gehalten aan clenbuterol (resp. <3-10 en 4-7 ng/ml). Tussen de dieren waren relatief grote verschillen waarneembaar tot een factor 15. Dit kan mede zijn veroorzaakt door de opzet van het experiment, waarbij 4 dieren gezamenlijk een gemiddelde dosering van $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ lichaamsgewicht aan clenbuterol via het voer kregen toegediend. Door een verschillende voeropname konden de dieren derhalve een wisselende hoeveelheid clenbuterol consumeren.

In een studie van Rinke [1990] worden gehalten van 0,6 tot 10,6 ng/ml gemeten na toediening van $0,8 \mu\text{g}/\text{kg}$ lichaamsgewicht. Een hogere dosering van $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ lichaamsgewicht resulteerde in gehalten variërend tussen 0,6 en 112 ng/ml. Eigen onderzoek gaf concentraties te zien tussen 1 en 70 ng/ml bij mestkalveren, met grote inter-individuele verschillen.

Toediening van testosteron lijkt een (niet significante) effect te hebben op de clenbuterol concentratie in de urine, de concentratie is lager ($p=0,08$, geometrische gemiddelden per groep 4,8 ng/ml [niet behandeld met T] versus 3,1 ng/ml [incl. behandeling met T]). Oestradiol-toediening heeft geen merkbare invloed. De gehalten aan clenbuterol in de uitsluitend met clenbuterol behandelde dieren lagen gemiddeld iets hoger in vergelijking tot de overige groepen.

Zoals verwacht kon geen clenbuterol in de urine van de niet met clenbuterol behandelde dieren aangetoond worden (<3 ng/ml, $p<0,001$).

In Tabel 2 worden de gemiddelde gehalten aan clenbuterol gevonden in de op de slachtdatum genomen urinemonsters van met clenbuterol alleen en die gecombineerd met steroïden behandelde dieren vergeleken. De gemiddelde clenbuterolgehalten van de twee groepen waarbinnen de dieren behandeld zijn met clenbuterol in combinatie met 17β -testosteron liggen lager dan die van de groepen waarbij alleen met clenbuterol en de combinatie met 17β -oestradiol is behandeld. Door de grote spreiding van de clenbuterolgehalten binnen de groepen is een significant verschil tussen de dieren behandeld met alleen clenbuterol en die in combinatie met 17β -testosteron niet waar te nemen.

Tabel 2: Gehalten aan clenbuterol (ng/ml) in urine genomen op de slachtdatum van met clenbuterol en combinaties van clenbuterol en steroïden behandelde dieren.

	Cb	Cb + T	Cb + E2	Cb + E2 + T
n	4	5	5	5
gemiddeld	19,9 ng/ml	7,6 ng/ml	14,6 ng/ml	10,4 ng/ml
standaard- deviatie	10,9 ng/ml	5,1 ng/ml	11,2 ng/ml	10,3 ng/ml

4.3.2 Clenbuterol in bloedplasma

Voor het bepalen van clenbuterol in plasmamonsters werd in eerste instantie geen monsteropwerking toegepast. Hier werd bij monsters van niet met clenbuterol behandelde dieren een veel te hoge achtergrond gevonden ($7,2 \pm 1,8$ ng/ml; $n=5$).

Door extractie met TBME werd voor de blanco plasmamonster een veel lagere achtergrond gevonden ($< 0,04$ ng/ml, de detectiegrens).

De gemeten waarden vanaf de tweede dag van toediening zijn laag en variëren tussen de 0,09 en 0,3 ng/ml. Tussen de dieren werden verschillen van een factor 3 gevonden, welke mede worden veroorzaakt door verschillen in de toegediende dosering.

In vergelijking met de door Rinke [1990] bij kalveren gemeten waarden is een grote mate van overeenkomst te zien, zij het dat bij de kalveren gehalten tussen de 0,2 en 1,0 ng/ml werden gevonden na behandeling met $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ lichaamsgewicht. Bij behandeling van kalveren met de therapeutische dosering van $0,8 \mu\text{g}/\text{kg}$ lichaamsgewicht werden gehalten tussen 0,05 en 0,2 ng/ml gemeten.

4.3.3 17β -Oestradiol in urine

De 17β -oestradiolgehalten gemeten in de urinemonsters staan weergegeven in bijlage 4. In figuur 2 worden de 17β -oestradiolgehalten tijdens de proefperiode gevonden in de urinemonsters van vijf met oestradiol behandelde bokjes, uitgezet tegen het aantal proefdagen.

De bokjes werden op de proefdagen 0, 7, 14 en 21 behandeld met de hormonen 17β -oestradiol en/of 17β -testosteron.

Na de eerste behandeling wordt 2-3 dagen later bij 4 van de 5 dieren een maximaal gehalte aan 17β -oestradiol in de urine gevonden (700-2000 pg/ml). Een tweede maximum wordt pas gevonden op de 15e/16e proefdag en het lijkt dat de dieren zijn geslacht op het moment dat het 17β -oestradiolgehalte naar een derde maximum zou stijgen. Opvallend is dat tijdens de proefperiode 4 injecties zijn gegeven en slechts 2 maxima worden waargenomen. Vergeleken met de oestradiol-gehalten in de urine na de eerste injectie lijken latere injecties te resulteren in een vertraagde uitscheiding van 17β -oestradiol in de urine. Echter een vertekend beeld kan optreden door het relatief geringe aantal meetpunten.

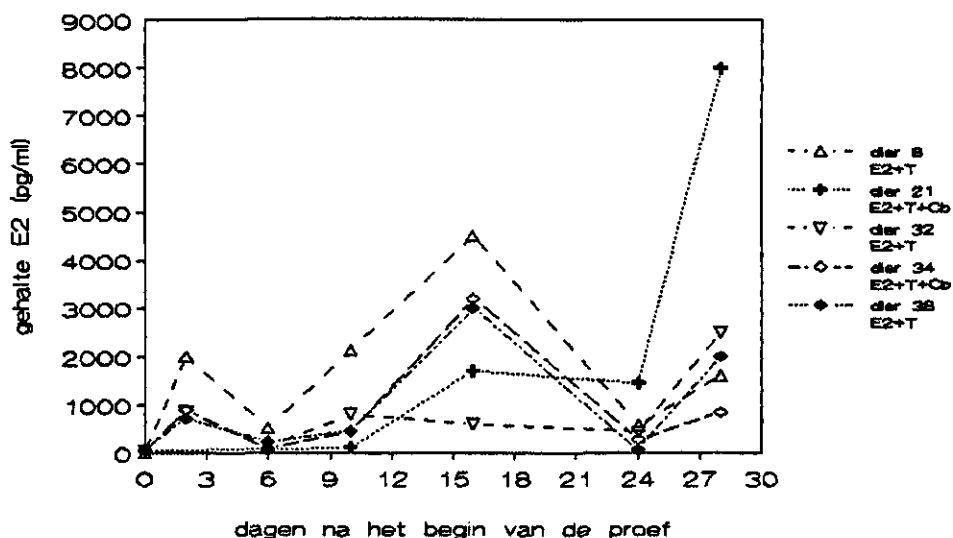
In tabel 3 worden de gemiddelde 17β -oestradiolgehalten gevonden in de op de slachtdatum genomen urinemonsters van met 17β -oestradiol en combinaties met 17β -testosteron en/of clenbuterol behandelde dieren vergeleken. Gecombineerd gebruik van 17β -oestradiol met clenbuterol leidde tot een hoger gehalte aan 17β -oestradiol in de urine ($p=0,03$).

Van de 19 met 17β -oestradiol behandelde dieren werd bij 17 dieren na de slacht, ten opzichte van de controledieren, een duidelijk verhoogd 17β -oestradiolgehalte in de urine gevonden.

In urinemonsters ($n=60$) van bokjes die niet met 17β -oestradiol zijn behandeld wordt een 17β -oestradiolgehalte gevonden van 160 ± 170 pg/ml ($p<0,001$). Opvallend was een periode-effect in de oestradiolconcentraties. Binnen de proefopzet vallen 5 perioden te onderscheiden, waarbij in de laatste periode lager gehalten waargenomen werden (geometrische gemiddelden van de 5 perioden 1,1, 1,8, 2,0, 1,1 en 0,5 ng/ml, $p=0,03$).

De gemeten gehalten liggen iets hoger in vergelijking tot onbehandelde mannelijke mestkalveren werden bij de 'ILOB kalverproef' [Arts et al., 1989] gehalten aan 17β -oestradiol in urine van behandelde en blanco dieren gevonden van <700 pg/ml. Hierbij moet ook rekening worden gehouden met methodische verschillen. De gehalten gemeten bij de met 17β -oestradiol behandelde geiten zijn daarentegen wat lager in vergelijking tot de mestkalveren.

De toediening van clenbuterol heeft geen merkbare invloed op het van nature voorkomende 17β -oestradiolgehalte.



Figuur 2: 17β-Estradiolgehalten (pg/ml) in urinemonsters van met 17β-estradiol behandelde bokjes (n=5). De bokjes werden op de dagen 0, 7, 14 en 21 van de proef geïnjecteerd.

Tabel 3: Gehalten aan 17β-oestradiol (ng/ml) in urine genomen op de slachtdatum van met 17β-oestradiol en combinaties met clenbuterol en/of 17β-testosteron behandelde dieren.

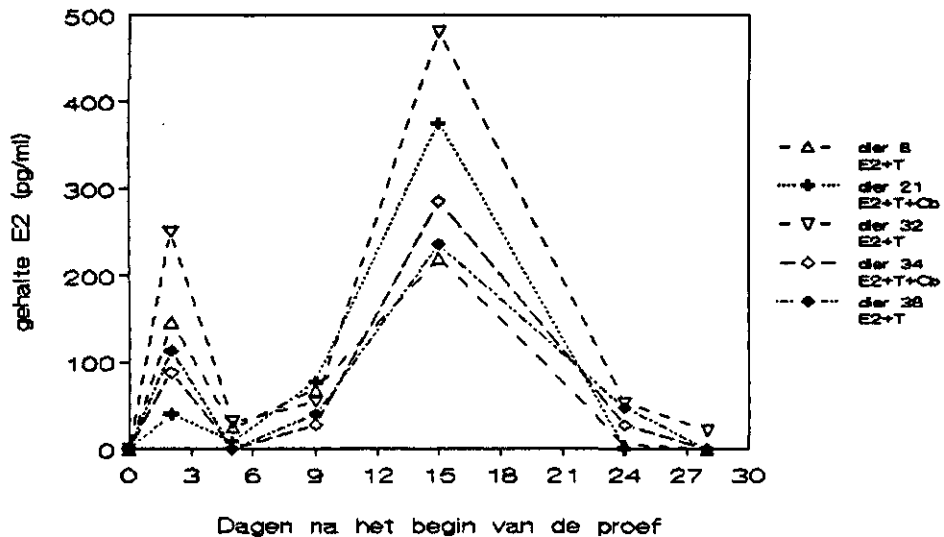
	Blanco	E2	E2 + T	E2 + E2 + Cb	T + Cb
n	5	4	5	5	5
gemiddeld	0,26 ng/ml	6,2 ng/ml	4,0 ng/ml	16,2 ng/ml	46,2 ng/ml
standaard-deviatie	0,16 ng/ml	3,9 ng/ml	3,7 ng/ml	13,1 ng/ml	76,7 ng/ml

4.3.4 17β-oestradiol in bloedplasma

De 17β-oestradiolgehalten gevonden in de plasmamonsters staan weergegeven in bijlage 4. In de plasmamonsters (n=60) van de bokjes die niet zijn behandeld met 17β-oestradiol is in alle gevallen 17β-oestradiol niet aantoonbaar (<20 pg/ml). Ook bij niet behandelde mestkalveren is 17β-oestradiol niet aantoonbaar [Arts et al., 1989].

In figuur 3 worden de 17β-oestradiolgehalten gevonden in de plasmamonsters van vijf met alleen 17β-oestradiol en combinaties met 17β-testosteron en clenbuterol behandelde bokjes, genomen op een aantal dagen tijdens de proefperiode, uitgezet tegen het aantal dagen na het begin van de proef.

Net als bij de urinemonsters (zie figuur 2) worden ook hier slechts twee maxima waargenomen. Een verschil met de resultaten verkregen bij de urinemonsters is dat het 17β -oestradiolgehalte in plasma op de slachtdatum lager is dan de detectiegrens (<20 pg/ml).



Figuur 3: 17β -Estradiolgehalten (pg/ml) in plasmamonsters van met 17β -estradiol behandelde bokjes (n=5). De bokjes zijn op de dagen 0, 7, 14 en 21 geïnjecteerd.

De verhoudingen van de 17β -oestradiolgehalten in urine en bloedplasma van de vijf met 17β -oestradiol behandelde bokjes zijn weergegeven in tabel 4. Hieruit blijkt dat het gehalte in urine over het algemeen veel hoger is dan in plasma. Bij drie van de vijf bokjes is deze verhouding redelijk constant (8-18).

In vergelijking tot mestkalveren [Arts et al., 1989] is de toename van het gehalte aan 17β -oestradiol bij de bokken geringer.

Tabel 4: Verhoudingen van de 17β -oestradiolgehalten in urine en bloedplasma van vijf met 17β -oestradiol behandelde bokjes.

Dag na begin van de proef	Verhouding 17β -oestradiol in urine versus bloedplasma				
	Diernr. 8 E2 + T	Diernr. 21 Cb + E + T	Diernr. 32 E2 + T	Diernr. 34 Cb + E + T	Diernr. 38 E2 + T
0	5	3	0,2	3	4
3	13	-	29	10	7
5	26	2	3	4	12
9	35	6	2	15	12
18	20	18	12	11	12
22	12	0,3	22	9	1
gemiddeld	18,5	5,9	11,4	8,7	8,0
s.d.	10,8	7,1	11,9	4,5	4,8

4.3.5 17β -testosteron in urine

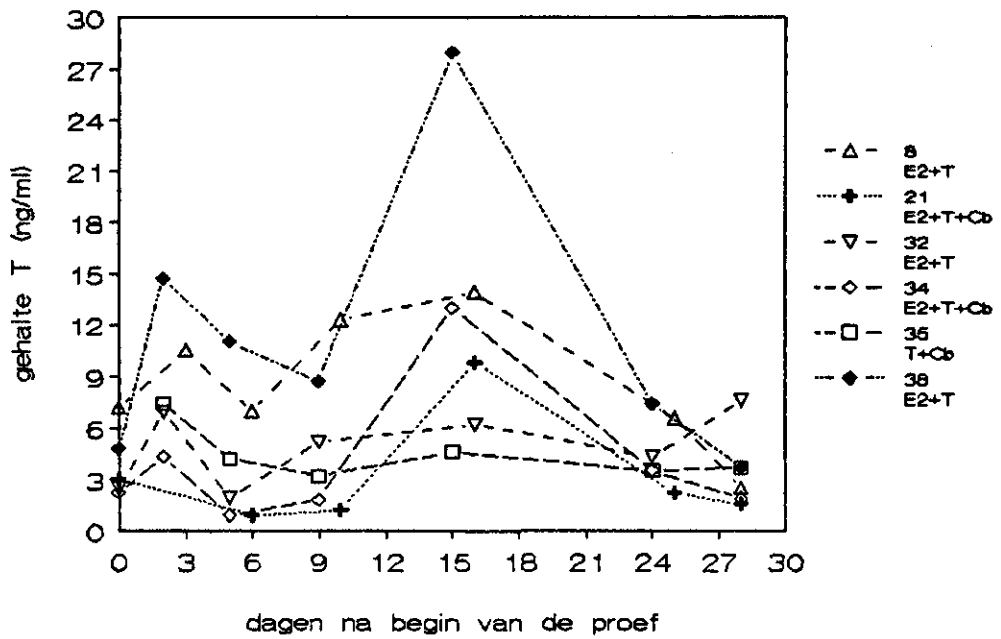
De 17β -testosterongehalten van alle urinemonsters zijn weergegeven in bijlage 4. In figuur 4 worden de 17β -testosterongehalten gevonden in de urinemonsters van zes met alleen 17β -testosteron en combinaties behandelde bokjes, genomen op een aantal proefdagen tijdens de proefperiode, uitgezet tegen het aantal dagen na het begin van de proef.

In figuur 5 zijn de 17β -testosterongehalten van de niet met 17β -testosteron behandelde bokjes ($n=6$) uitgezet. Het gehalte aan 17β -testosteron in de niet met 17β -testosteron behandelde bokjes bedraagt $7,1 \pm 4,5$ ng/ml ($n=54$). Het gehalte aan 17β -testosteron in de met 17β -testosteron behandelde bokjes bedraagt $6,2 \pm 5,5$ ng/ml ($n=54$). Hieruit kan geconcludeerd worden dat door de behandeling met 17β -testosteron geen significante verandering ($p=0,34$) van het 17β -testosterongehalte in de urine wordt veroorzaakt. Wel lijkt een verlaging van het gehalte waarneembaar.

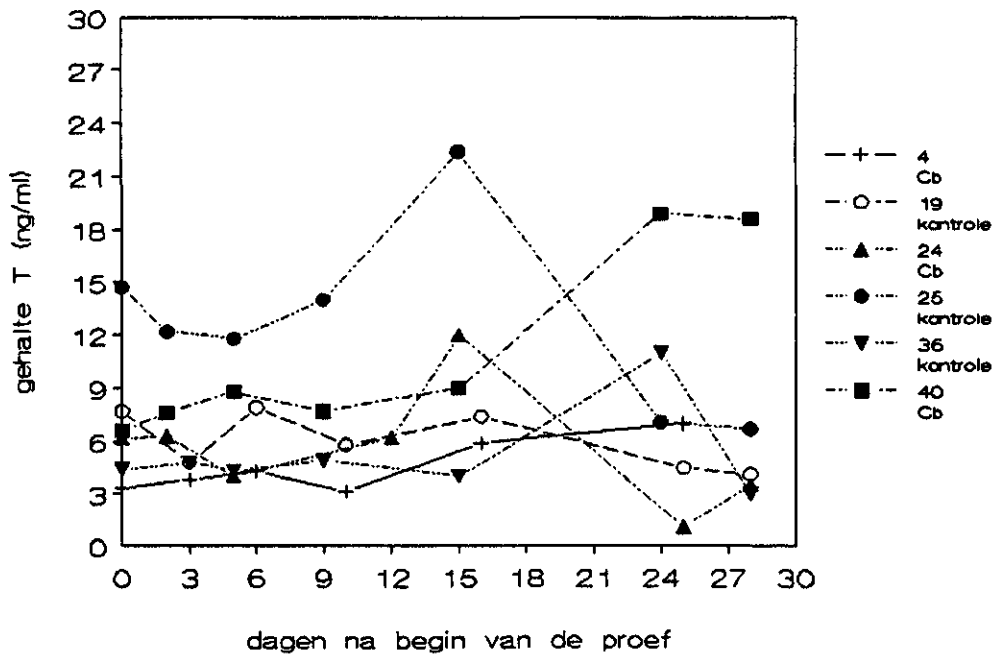
Behandeling met clenbuterol lijkt een toename van het testosterongehalte te veroorzaken; de stijging is echter niet significant ($p=0,19$) in tegenstelling tot de testosterongehalten in plasma, waar wel een significante stijging ($p=0,02$) te zien was.

In tabel 5 worden de gemiddelde 17β -testosterongehalten gevonden in de op de slachtdatum genomen urinemonsters van met 17β -testosteron en combinaties met 17β -oestradiol en/of clenbuterol behandelde dieren vergeleken. Uit variantieanalyse blijkt dat behandeling met clenbuterol een effect heeft op de gehalten van 17β -testosteron; de gehalten in de urine nemen toe.

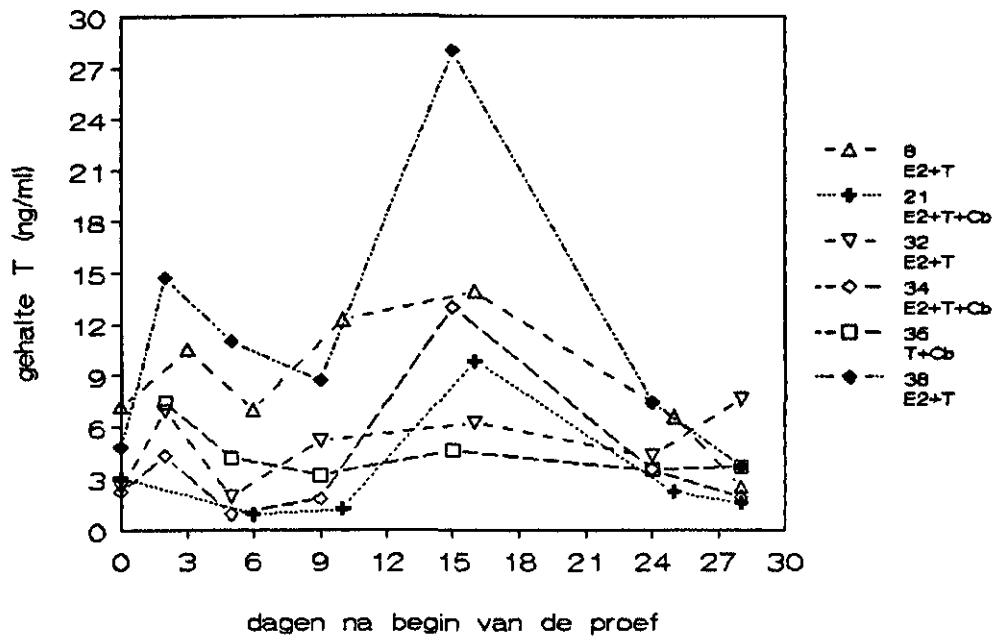
De 17β -testosterongehalten van de onbehandelde en behandelde bokken komt globaal overeen met de bij het mestkalf gevonden waarden [Arts et al., 1989].



Figuur 4: 17β-Testosterongehalten (ng/ml) in urinemonsters van met 17β-testosteron behandelde bokjes. De bokjes zijn op de dagen 0, 7, 14 en 21 geïnjecteerd.



Figuur 5: 17β-Testosterongehalten (ng/ml) in urinemonsters van niet met 17β-testosteron behandelde bokjes (n=6).



Figuur 4: 17 β -Testosterongehalten (ng/ml) in urinemonsters van met 17 β -testosteron behandelde bokjes. De bokjes zijn op de dagen 0, 7, 14 en 21 geïnjecteerd.

Tabel 5: Gehalten aan 17 β -testosteron (ng/ml) in urine genomen op de slachtdatum van met 17 β -testosteron en combinaties met 17 β -oestradiol en/of clenbuterol behandelde dieren.

	Blanco	T	T + E2	T + Cb	T + E2 + Cb
n	6	5	5	5	5
gemiddeld	4,4 ng/ml	3,5 ng/ml	4,0 ng/m	4,5 ng/ml	9,7 ng/ml
standaard- deviatie	2,4 ng/ml	1,7 ng/ml	2,2 ng/ml	1,1 ng/ml	10,8 ng/ml

Tabel 6: Gehalten aan 17β -testosteron (ng/ml) in bloedplasma genomen op de slachtdatum van met 17β -testosteron en combinaties met 17β -oestradiol en/of clenbuterol behandelde bokjes.

	Blanco	T	T + E2	T + Cb	T + E2 + Cb
n	5	5	5	5	5
gemiddeld	0,32 ng/ml	0,24 ng/ml	0,40 ng/ml	1,52 ng/ml	0,44 ng/ml
standaard-deviatie	0,27 ng/ml	0,09 ng/ml	0,35 ng/ml	1,45 ng/ml	0,54 ng/ml

4.3.6 17β -testosteron in bloedplasma

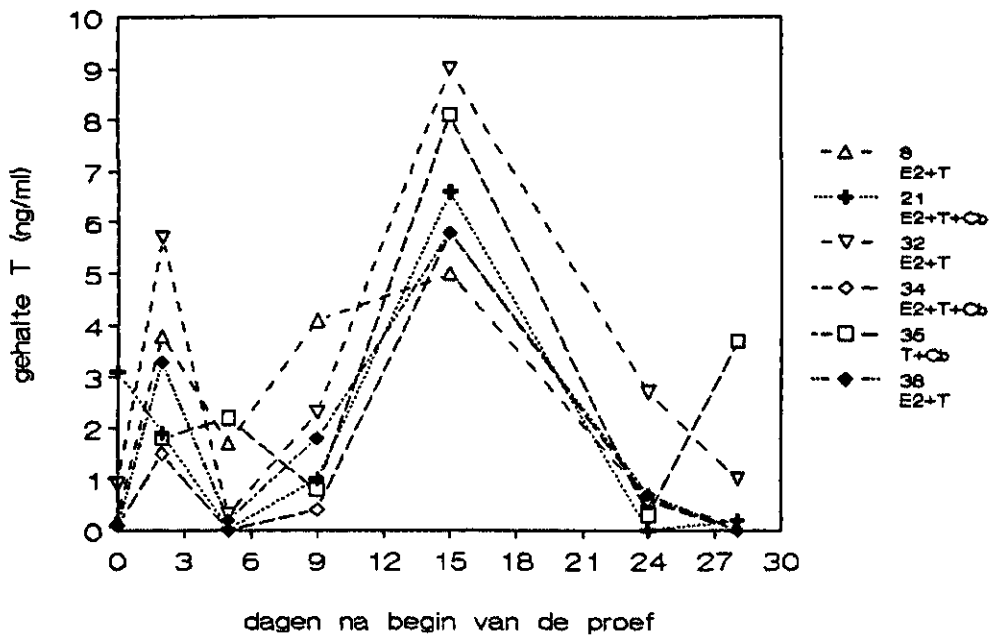
De 17β -testosterongehalten van alle bloedplasmamonsters zijn weergegeven in bijlage 2. In figuur 6 worden de 17β -testosterongehalten gevonden in de zes met alleen 17β -testosteron en combinaties behandelde bokjes, genomen op een aantal dagen tijdens de proefperiode, uitgezet tegen het aantal na het begin van de proef. In figuur 7 zijn de gegevens van de monsters afkomstig van de niet met 17β -testosteron behandelde bokjes weergegeven.

Het gehalte aan 17β -testosteron in de plasmamonsters (n=54) van niet met 17β -testosteron behandelde dieren bedraagt $1,5 \pm 1,3$ ng/ml. Het gehalte aan 17β -testosteron in de plasmamonsters (n=55) van de tijdens de proefperiode met 17β -testosteron behandelde bokjes bedroeg $1,8 \pm 2,2$ ng/ml. Ook in bloedplasma werd gemiddeld geen significant veranderd gehalte aan 17β -testosteron gevonden bij met 17β -testosteron behandelde dieren. Analoog aan de gehalten in urine werd een trend van verlaging gezien ($p=0,44$). Wel is bij de met 17β -testosteron behandelde dieren een verhoging van 17β -testosteron in plasma te zien op de 15e dag van de proefperiode ($6,7 \pm 1,5$ ng/ml).

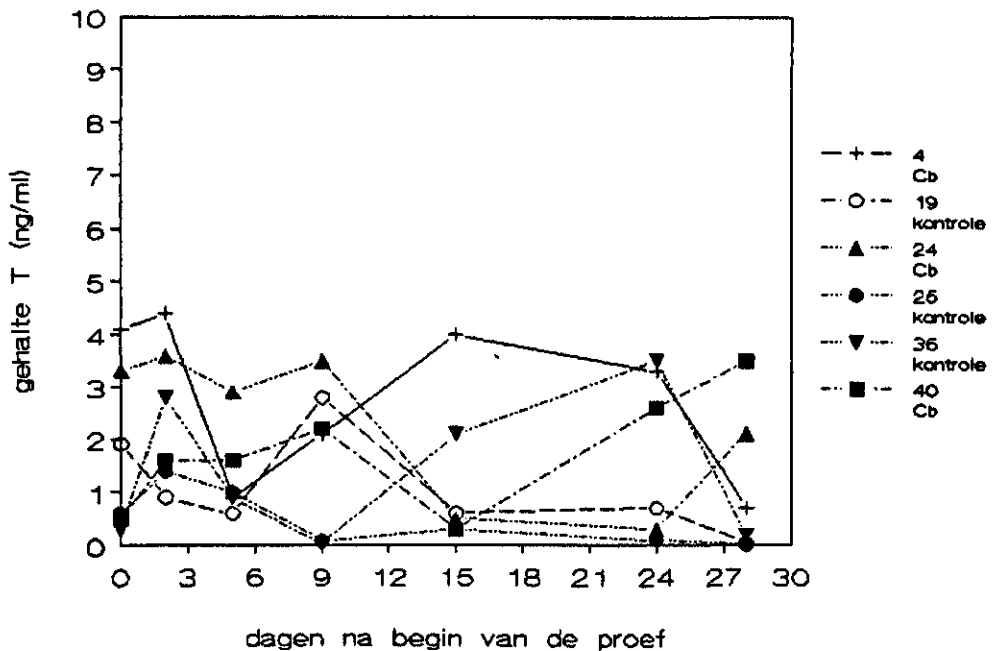
Opmerkelijk is dat clenbuterol-toediening aanleiding gaf tot een significante verhoging van de testosteron-gehalten in het plasma ($p=0,02$, geometrische gemiddelden 0,31 [niet behandeld met clenbuterol] versus 0,59 ng/ml [behandeld met clenbuterol]).

In tabel 6 worden de 17β -testosterongehalten gevonden in bloedplasma op de slachtdatum van zes met 17β -testosteron behandelde dieren vergeleken en hieruit blijkt dat de gehalten niet significant verschillen. Het effect van clenbuterol op de testosteron uitscheiding, zoals dit was geconstateerd bij de urinegehalten, was zichtbaar als trend, zij het niet significant.

Analoog aan de gehalten in urine is ook hier een goede overlap waarneembaar tussen de gehalten gemeten bij de geitebokken en mestkalveren, onafhankelijk van een behandeling met 17β -testosteron.



Figuur 6: 17β-Testosterongehalten in bloedserum (ng/ml) van met 17β-testosteron behandelde bokjes (n=6). De bokjes zijn op de dagen 0, 7, 14 en 21 geïnjecteerd.



Figuur 7: 17β-Testosterongehalten (ng/ml) in plasmamonsters van niet met 17β-testosteron behandelde bokjes (n=6).

4.4 Conclusie

Bij de met clenbuterol en combinaties met 17β -oestradiol en/of 17β -testosteron behandelde bokjes werden in de tijdens de proefperiode genomen urinemonsters, met de door het RIKILT-DLO ontwikkelde EIA, gehalten aan clenbuterol gevonden van <3 tot 70 ng/ml. Van de in totaal 54 onderzochte urinemonsters afkomstig van met clenbuterol behandelde proefdieren werden er 46 als positief beoordeeld (gehalte ≥ 3 ng/ml). Toediening van testosteron lijkt de gehalten aan clenbuterol in de urine te verlagen (niet significant, $p=0,08$).

Het toedienen van 17β -oestradiol heeft bij de proefdieren geeft een duidelijke verhoging van het 17β -oestradiolgehalte in urine en plasma, ten opzicht van het van nature voorkomend gehalte ($0,16 \pm 0,17$ ng/ml voor urine en $<0,02$ ng/ml voor plasma). Door gecombineerd gebruik van 17β -oestradiol en clenbuterol werd de concentratie van 17β -oestradiol in de urine significant hoger ($p=0,03$). Tijdens de proefperiode wordt bij drie dieren een goede correlatie gevonden tussen de 17β -oestradiolgehalten in urine en bloed. Hierbij ligt het gehalte in urine $15-20$ maal hoger dan het gehalte in plasma.

Het toedienen van 17β -testosteron heeft geen duidelijk effect op het van nature voorkomend gehalte van 17β -testosteron in urine. Eerder is een trend tot verlaging zichtbaar, zowel in urine als plasma. Behandeling met clenbuterol leidde tot een niet-significante verhoging van het testosterongehalte in de urine ($p=0,19$). Het testosterongehalte in plasma werd echter wel significant beïnvloed door behandeling met clenbuterol ($p=0,02$).

5 NMR ONDERZOEK AAN URINE EN SPIERWEEFSEL

5.1 Inleiding

In het kader van het project "Ontwikkeling van fysiologische screenings- en monitoringsmethoden via metabolietprofilering m.b.v. NMR" is er een RIKILT-rapport (nr. 91.56) verschenen. Bijlage 1 is een samenvatting van dit rapport. Hieruit blijkt, dat de verhouding tussen lactaatconcentratie en creatineconcentratie - zoals m.b.v. NMR gevonden - in urine indicatief is voor het gebruik van beta-agonisten. Dit onderzoek is gedaan bij mestkalveren.

In het verlengde hiervan is er m.b.v. NMR gekeken naar de metabolietprofielen van urines van bokken die met beta-agonisten behandeld zijn. De onderzoeksstrategie en details t.a.v. materialen en methoden zijn in rapport nr. 91.56 uitvoerig beschreven. Voorbeelden van NMR-spectra zijn te vinden in bijlagen 2a, 2b, 3a, 3b, 3c.

Uit de NMR resultaten blijkt, dat de lactaat/creatine verhouding ook bij bokken indicatief is voor het gebruik van beta-agonisten. Er werd besloten om lactaat- en creatineconcentraties enzymatisch te bepalen m.b.v. een autoanalyser (analoog rapport nr. 91.56). Naast controledieren en met beta-agonisten behandelde dieren zijn ook de met oestradiol en testosteron behandelde dieren meegenomen. De gegevens staan vermeld in tabel 1. De lactaat/creatine verhouding na ca. 4 weken is weergegeven in tabel 2. Grafiek 1 laat de spreiding in L/C verhouding (na ca. 4 weken) zien bij gelijkelijk behandelde dieren.

Aan de "longissimus dorsus" (rugspier) zijn NMR experimenten gedaan. Het is mogelijk om NMR spectra van een stuk spier te verkrijgen zonder extracten te hoeven maken. De spiermonsters zijn geprepareerd zonder subcutaan vet.

5.2 Resultaten

Uit de resultaten in tabel 1 blijkt, dat het merendeel van de behandelde dieren een hoge L/C verhouding vertonen en dat de controledieren lage waarden hebben. Nieuw is, dat ook testosteron en oestradiol de L/C verhouding in urines van bokken beïnvloeden.

Dit zou kunnen betekenen, dat de L/C verhouding in urine mogelijkheden biedt voor screening en monitoring op groeibevorderaars in een wat meer algemene zin.

Door een verhouding tussen lactaat en creatine te nemen in plaats van een enkele meting van hetzij lactaat hetzij creatine wordt het effect van verdunning van urine (b.v. door grote wateropname door het dier) uitgeschakeld. Hierdoor wordt screening met de verhouding lactaat/creatine gevoelig. Uit de experimenten tot nu toe blijkt, dat het gebruik van beta-agonisten een tegengestelde effect heeft op

lactaat vs. creatine; er is namelijk sprake van een toename van lactaat en afname van creatine.

Uit de proeven op de bokken blijkt, dat de creatineconcentratie (gemiddeld) binnen een week na de eerste behandeling sterk afneemt om daarna in de loop van de verdere 3 weken zich herstelt. De lactaatconcentratie (gemiddeld) daarentegen begint pas na ca. 4 weken toe te nemen.

Dit tegengesteld effect is fysiologisch aannemelijk te maken. Beta-agonisten verminderen de eiwitafbraak in geiten, waardoor er relatief een grotere spiermassa ontstaat. Creatine is betrokken in de directe energievoorziening van spieren (Maltin e.a., 1990). Meer spiermassa betekent een grotere behoefte aan creatine. Dit hangt weer samen met een verminderde creatineuitscheiding in de urine. Een neveneffect van het gebruik van beta-agonisten is een verhoogde thermogenese (brandstof wordt in warmte omgezet) (Fiems, 1989; Zimmerli & Blum, 1990); dit gaat gepaard met een verhoogde lactaatproductie, wat indirect via verhoogde concentraties in het bloed tot verhoogde uitscheiding leidt in de urine.

Natuurlijke spreidingen in L/C verhoudingen kunnen er toe leiden, dat vals negatieve en vals positieve scores voorkomen. In tabel 2 zijn L/C verhoudingen na ca. 4 weken opgenomen. Als er aangenomen wordt, dat dieren positief zijn als de L/C verhouding boven de 90 stijgt, dan zijn 6 van de 32 positieve dieren vals negatief en is 1 van de 10 controledieren vals positief. Door waardes van b.v. 4 of 5 dieren uit te middelen wordt de invloed van spreidingen grotendeels weggenomen, waardoor een betrouwbare resultaat ontstaat (zie tabel 2). Op grond van de resultaten blijkt elke combinatie van 5 blanco urines blanco te scoren, terwijl elke combinatie van 4 of 5 positieve urines van gelijk behandelde dieren positief scoren.

Punten van aandacht in dit onderzoek - ter verdere onderbouwing - behoren nog te zijn : de behandelingsduur, soort beta-agonist, andere groeibevorderaars, wachttijden, "stress"-factoren, dieet e.d. Het is ook noodzakelijk grotere aantallen urines te onderzoeken voor een verdere statistische onderbouwing.

Wat betreft het onderzoek aan de rugspier blijkt behalve in vetgehalte geen significant verschil te zijn tussen spieren van controle en met beta-agonist behandelde dieren. Gemiddeld genomen hebben de controle monsters tweemaal zoveel vet als de met beta-agonisten behandelde dieren. Een voorbeeld van een ¹³C-spectrum van een spiermonster van een controle dier en een met beta-agonist behandelde dier zijn gegeven (zie resp. figuur 4a en 4b).

URINEMONSTERS BOKKENPROEF

proefplannummer iwo-454.0017

project RIKILT 505.0623 505.0022

afkortingen :

C = clenbuterol

E = oestradiol

T = testosteron

- = controle

Tabel 1. Totaaloverzicht van analytische bepalingen m.b.v. een autoanalyser.

dier nummer	RIKILT nummer	behandeling	monster datum	lactaat gehalte (ppm)	creatine gehalte (ppm)	creatinine gehalte (ppm)	lactaat/ creatine (ppb/ppm)
1	52650	E	24/4	-	-	-	-
2	52651	E+C	24/4	90	410	392	220
3	52652	E+C	26/4	150	176	1017	852
4	52653	C	27/3	10	133	93	75
	52654	C	29/3	7	27	130	260
	52655	C	1/4	11	91	217	121
	52656	C	5/4	7	68	187	103
	52657	C	11/4	4	22	113	182
	52658	C	20/4	7	15	352	467
	52659	C	24/4	-	-	-	-
5	52660	E+C	1/5	260	276	206	942
6	52661	E+C	23/4	126	83	228	1518
7	52662	T+C	23/4	73	208	148	351
8	52663	E+T	27/3	12	104	200	115
	52664	E+T	29/3	9	2	235	4500
	52665	E+T	1/4	11	0	320	>>
	52666	E+T	5/4	16	94	414	170
	52667	E+T	11/4	12	334	88	36
	52668	E+T	20/4	11	110	535	100
	52669	E+T	24/4	-	-	-	-
9	52670	T+C	26/4	28	108	170	259
10	52671	T	23/4	34	199	210	171
11	52672	-	23/4	6	165	105	36
12	52673	C	26/3	55	845	574	65
13	52674	C	23/4	20	309	342	65
14	52675	T+C	24/4	244	175	110	1394
15	52676	-	26/4	47	230	221	204
16	52677	E	26/4	57	175	107	326
17	52678	E	23/4	106	180	118	589
18	52679	T	24/4	189	206	160	917
19	52680	-	27/3	16	73	125	219
	52681	-	29/3	6	150	149	40
	52682	-	1/4	11	153	291	72
	52683	-	5/4	6	84	251	71
	52684	-	11/4	9	324	339	28
	52685	-	20/4	9	188	239	48
	52686	-	24/4	23	260	354	88
20	52687	E+T	23/4	65	283	599	230

21	52688	E+T+C	27/3	7	124	165	56
	52689	E+T+C	29/3	-	-	-	-
	52690	E+T+C	1/4	6	24	269	250
	52691	E+T+C	5/4	5	110	115	45
	52692	E+T+C	11/4	5	19	153	263
	52693	E+T+C	20/4	8	70	381	114
	52694	E+T+C	24/4	132	128	106	1031
22	52695	T	26/4	45	275	62	164
23	52696	E+T+C	23/4	-	-	-	-
24	52697	C	3/4	87	311	179	280
	52698	C	5/4	10	200	118	50
	52699	C	8/4	7	151	94	46
	52700	C	15/4	17	314	295	54
	52701	C	18/4	18	708	450	25
	52702	C	28/4	21	89	501	178
	52703	C	1/5	70	121	188	579
25	52704	-	3/4	16	153	285	105
	52705	-	5/4	9	232	203	39
	52706	-	8/4	12	258	206	47
	52707	-	12/4	-	-	-	-
	52708	-	18/4	30	415	597	72
	52709	-	27/4	17	284	202	60
	52710	-	1/5	-	-	-	-
26	52711	E+T	26/4	88	243	271	362
27	52712	E+T+C	26/4	409	299	238	1370
28	52713	E	1/5	52	246	110	211
29	52714	T+C	1/5	-	-	-	-
30	52715	T	1/5	23	243	101	95
32	52716	E+T	3/4	3	181	83	17
	52717	E+T	5/4	5	72	138	70
	52718	E+T	8/4	6	0	250	>>
	52719	E+T	12/4	12	216	326	56
	52720	E+T	19/4	8	60	180	133
	52721	E+T	27/4	9	49	325	184
	52722	E+T	1/5	131	535	481	245
33	52723	E+C	15/5	27	157	441	172
34	52724	E+T+C	3/4	9	273	107	33
	52725	E+T+C	5/4	12	0	183	>>
	52726	E+T+C	8/4	5	0	86	>>
	52727	E+T+C	12/4	5	0	117	>>
	52728	E+T+C	18/4	9	369	203	24
	52729	E+T+C	27/4	10	24	615	417
	52730	E+T+C	1/5	160	731	331	219
35	52731	T+C	19/4	6	353	150	17
	52732	T+C	22/4	8	111	144	72
	52733	T+C	26/4	6	161	89	37
	52734	T+C	2/5	6	70	132	86
	52735	T+C	11/5	10	27	92	370
	52736	T+C	15/5	33	195	69	169
36	52737	-	17/4	12	327	76	37
	52738	-	20/4	10	180	195	56
	52739	-	22/4	8	232	126	35
	52740	-	26/4	-	-	215	-
	52741	-	2/5	13	392	503	33
	52742	-	11/5	14	228	401	61
	52743	-	15/5	20	463	441	43
37	52744	T	15/5	91	71	89	1282
38	52745	E+T	17/4	10	244	183	41
	52746	E+T	19/4	9	35	195	257
	52747	E+T	22/4	13	676	277	19
	52748	E+T	26/4	7	19	286	368
	52749	E+T	2/5	11	171	253	64
	52750	E+T	11/5	17	64	471	266
	52751	E+T	15/5	29	654	404	44

40	52752	C	17/4	8	211	192	38
	52753	C	19/4	6	51	142	118
	52754	C	22/4	7	256	137	27
	52755	C	26/4	6	67	135	90
	52756	C	2/5	20	417	308	48
	52757	C	11/5	14	334	446	42
	52758	C	15/5	60	882	589	68
41	52759	E+T+C	17/4	8	183	219	44
42	52760	E	15/5	11	141	258	78

URINEMONSTERS BOKKENPROEF
 proefplannummer ivvo-454.0017
 project RIKILT 505.0623 505.0022

afkortingen :
 C = clenbuterol
 E = oestradiol
 T = testosteron
 - = controle
 -* = controle uit een andere proef

Tabel 2.
Overzicht van lactaat/creatine (L/C) verhoudingen na ca. 4 weken behandeling.

Behandeling	L/C verhouding (ppb/ppm)					gem. L/C
E	326	589	211	78		301
T	171	917	164	95	1282	526
C	467	65	65	579	68	249
E+T	100	230	362	245	44	196
E+C	220	852	942	172	1518	741
T+C	351	259	1394	169		543
E+T+C	1031	1370	44	219		666
-	36	204	88	60	43	86
-*	12	46	44	44	20	33

6 CHEMISCHE ANALYSE VAN GEHALTEN AAN EIWIT, VOCHT EN VET IN SPIERWEEFSEL

6.1 Inleiding

Van beta-agonisten is bekend dat zij de spier en vet aanzet beïnvloeden. Om te kijken of ook binnen een spier verschuivingen optreden in de samenstelling zijn twee grote skeletspieren onderzocht. Van de spieren longissimus dorsi en biceps femoris zijn de gehalten aan eiwit, vocht en vet bepaald.

6.2 Materiaal en methoden

De bepalingen zijn verricht volgens de Nederlandse normen voor vleesprodukten.

Voor vocht NEN 3440

Voor vet NEN 3443

Voor eiwit NEN 3442

6.3 Resultaten chemische analyse van de longissimus dorsi

controle	Rikiltno.	water %	vet %	eiwit %
dier 11	52998	74,6	3,5	21,3
15	53002	76,1	1,7	21,6
19	53006	75,3	2,7	21,6
25	53012	76,9	0,9	22,0
36	53022	75,8	2,0	21,5
gemiddeld		75,7	2,2	21,6
Cien				
dier 4	52991	76,1	1,4	21,7
12	52999	76,2	1,7	21,4
13	53000	76,4	1,7	21,2
24	53011	76,9	0,9	21,6
40	53025	76,7	1,2	22,4
gemiddeld		76,5	1,4	21,6
E2				
dier 1	52988	75,9	2,3	21,3
16	53003	76,5	1,8	21,1
17	53004	74,6	2,7	22,5
28	53015	75,6	1,8	21,9
42	53026	75,8	2,3	21,3
gemiddeld		75,6	2,2	21,6

Clen+E2					
dier	2	52989	75,8	1,7	21,8
	3	52990	76,4	1,7	21,2
	5	52992	76,8	0,9	21,7
	6	52993	75,3	2,4	21,6
	33	53019	76,0	1,5	21,7
gemiddeld			76,1	1,6	21,6

T					
dier	10	52997	geen monster aanwezig		
	18	53005	74,1	2,2	22,8
	22	53009	74,8	3,6	20,7
	30	53017	76,5	1,1	21,8
	37	53023	76,0	1,9	21,4
gemiddeld			75,4	2,2	21,7

Clen+T					
dier	7	52994	75,4	2,0	22,0
	9	52996	76,1	1,7	21,5
	14	53001	75,7	1,7	21,6
	29	53016	76,4	1,1	22,0
	35	53021	75,8	1,6	22,1
gemiddeld			75,8	1,6	21,8

E2+T					
dier	8	52995	76,5	1,7	21,1
	20	53007	75,5	2,4	21,2
	26	53013	75,6	1,6	21,5
	32	53018	76,2	1,6	21,5
	38	53024	76,6	1,9	21,2
gemiddeld			76,1	1,8	21,3

E2+T+Clen					
dier	21	53008	76,1	2,0	21,4
	23	53010	76,8	1,1	20,5
	27	53014	76,3	0,8	22,2
	34	53020	75,9	1,2	22,4
	41	gestorven			
gemiddeld			76,3	1,3	21,7

In bijlage 6, figuur 1 zijn de vetgehalten van de longissimus dorsi weergegeven.

Resultaten van de chemische analyse van de biceps femoris

controle	Rikittno.	water %	vet %	eiwit %	
dier	11	52920	75,4	3,0	20,6
	15	52924	76,0	2,2	20,7
	19	52928	76,3	2,2	20,8
	25	52934	76,0	2,3	21,2
	36	52944	76,4	1,9	20,8
gemiddeld			76,0	2,3	20,8

Clen.					
dier	4	52913	75,8	1,7	21,4
	12	52921	75,8	1,8	21,4
	13	52922	76,8	1,6	20,7
	24	52933	77,1	1,0	21,6
	40	52947	76,4	1,8	21,2
gemiddeld			76,4	1,6	21,3
E2					
dier	1	52910	75,9	2,2	20,7
	16	52925	76,7	2,9	19,5
	17	52926	75,2	2,6	21,4
	28	52937	75,9	2,2	21,1
	42	52948	75,4	3,3	20,3
gemiddeld			75,8	2,6	20,6
Clen+E2					
dier	2	52911	75,4	2,0	21,6
	3	52912	75,7	2,3	21,0
	5	52914	76,6	1,4	21,0
	6	52915	76,0	2,4	21,2
	33	52941	76,2	2,2	21,2
gemiddeld			76,0	2,1	21,2
T					
dier	10	52919	75,7	2,6	20,6
	18	52927	74,8	2,8	21,3
	22	52931	75,9	2,5	20,8
	30	52939	76,4	1,5	20,9
	37	52945	76,0	2,2	20,5
gemiddeld			75,8	2,3	20,8
Clen+T					
dier	7	52916	75,9	2,1	21,7
	9	52918	75,9	2,2	21,2
	14	52923	75,8	1,9	21,7
	29	52938	76,3	1,5	21,5
	35	52943	75,3	2,7	21,5
gemiddeld			75,8	2,1	21,5
E2+T					
dier	8	52917	77,1	1,4	20,7
	20	52929	76,3	2,4	20,3
	26	52935	75,6	2,7	20,7
	32	52941	76,2	2,2	21,2
	38	52946	76,9	2,2	20,3
gemiddeld			76,4	2,2	20,6
E2+T+Clen					
dier	21	52930	75,0	2,4	21,8
	23	52932	77,4	1,5	20,3
	27	52936	76,4	1,6	21,5
	34	52942	76,6	1,1	21,4
	41	gestorven			
gemiddeld			76,3	1,6	21,2

In bijlage 6, figuur 2 staan de vetgehalten van de biceps femoris weergegeven.

6.4 Bespreking

Uit de bovenstaande resultaten blijkt dat de behandeling met clenbuterol, al of niet in combinatie met anabole steroïden, leidt tot een verlaging van het intramusculaire vetgehalte, terwijl het vocht en eiwitgehalte per gram spierweefsel door geen van de behandelingen beïnvloed werd.

Deze lagere vetgehalten kunnen van invloed zijn op de sensorische eigenschappen van het vlees.

7 CONCLUSIES EN DISCUSSIE

Uit het zoötechnisch verslag (hoofdstuk 2) bleek dat de proef een ongestoord verloop had en dat de gezondheidstoestand van de dieren uitstekend was.

De verschillen in groei tussen de verschillende proefbehandelingen waren in het algemeen niet groot. De met clenbuterol behandelde dieren hadden duidelijk meer vlees en minder vet aangezet. De met anabolen behandelde dieren tenderden naar een wat snellere groei en iets zwaardere spieren.

De verschillen m.b.t. de bloedkarakteristieken waren niet groot en wezen niet eenduidig naar een bepaalde proefbehandeling.

De variatie in de gewichten van de organen was groot, behalve die van het hart en de nier. Ook hier waren weinig systematische verschillen, alleen de gewichten van de thymus en testis van de E2/T groep waren wat lager dan van de andere groepen.

Wat betreft de effecten van clenbuterol op de spier- en vet aanzet, kan gesteld worden dat dit overeenkomt met bevindingen uit de literatuur bij kalveren en schapen (Hanrahan, 1987). De groeieffecten van de anabolen waren ook overeenkomstig de verwachtingen (Berende & Ruitkamp, 1983) en deze effecten pleiten voor het gebruik van de geitebok als modeldier voor het mannelijke vleeskalf.

Dat de bloedparameters geen verschillen tussen de groepen lieten zien, wordt waarschijnlijk veroorzaakt door de goede gezondheid van de dieren, waardoor de homeostatische mechanismen in staat zijn de diverse evenwichten te handhaven. Bij hogere doseringen en/of langduriger behandeling zullen uiteindelijk wel effecten optreden.

Het histologisch onderzoek liet in de prostaat duidelijke verschillen tussen de groepen zien. De met hormonen behandelde dieren vertoonden metaplastische veranderingen in het klierweefsel, zoals ook bij met hormonen behandelde kalveren worden aangetroffen (Groot, 1992). De met clenbuterol behandelde dieren vertoonden degeneratie van het urethra- en klierepitheel in de prostaat. Bij met combinaties behandelde dieren waren zowel de door oestrogenen veroorzaakte metaplasieën als de door clenbuterol veroorzaakte degeneratie waarneembaar. Bij met combinaties van E2 en Clen behandelde dieren leken de metaplastische afwijkingen sterker aanwezig dan bij de dieren die alleen met E2 waren behandeld.

De door clenbuterol veroorzaakte veranderingen bieden eventueel een mogelijkheid om, als bij het kalf overeenkomstige veranderingen worden aangetroffen, histologisch te screenen op het gebruik van clenbuterol. Recent onderzoek (Groot, 1992) heeft aangetoond dat dit inderdaad mogelijk is.

Behalve in de prostaat bleek clenbuterol ook degeneratieve veranderingen te induceren in de geslachtsorganen, de lever, de thymus en de pancreas. Opvallend waren epitheeldegeneratie, achtereenvolgens vacuolisatie, pyknose en necrose en fibrose.

In de lever werd tevens activatie van Kupffercellen en verhoogde koper aankleuring en aankleuring van endogeen peroxidase aangetroffen.

Oestrogenen veroorzaakten naast de reeds genoemde veranderingen in de prostaat tevens metaplastische veranderingen in de bulboürethraalklier, hyperplastische veranderingen in de zaadblaas en degeneratieve afwijkingen in de testis. De met testosteron behandelde dieren vertoonden hyperplasie en toegenomen secretie van de accessoire geslachtsklieren en degeneratie van de testis. Deze verschijnselen zijn overeenkomstig waarnemingen bij met dergelijke stoffen behandelde kalveren (Groot, 1992; Kroes, 1970).

De bij de met clenbuterol behandelde dieren waargenomen verschijnselen zijn niet eerder beschreven. Uit recent onderzoek bij kalveren behandeld met diverse beta-agonisten (Groot, 1992) is echter gebleken dat deze dieren overeenkomstige of duidelijker (Groot, 1992) verschijnselen vertoonden dan de geiten.

De gehalten aan clenbuterol, oestradiol-17 β en/of testosteron-17 β werden gedurende de proefperiode gemeten. De gehalten aan clenbuterol, gemeten met de op het RIKILT ontwikkelde EIA, varieerden van <3 tot 70 ng/ml. Van de onderzochte urinemonsters afkomstig van met clenbuterol behandelde dieren werd 85 % als positief beoordeeld (gehalte < 3 ng/ml).

Een verschil in het uitscheidingsprofiel tussen de proefdieren behandeld met alleen clenbuterol en die met combinaties met oestradiol-17 β benzoaat en testosteron propionaat is door de grote spreiding binnen de groepen niet waar te nemen.

Het toedienen van oestradiol-17 β benzoaat geeft bij de proefdieren een duidelijke verhoging van het oestradiol-17 β gehalte in het urine en plasma, ten opzichte van het van nature voorkomend gehalte (0,16 \pm 0,17 ng/ml voor urine en <0,02 ng/ml voor plasma). Door gecombineerd gebruik van oestradiol-17 β benzoaat en clenbuterol wordt de concentratie oestradiol-17 β in de urine significant hoger. Tijdens de proefperiode werd bij drie dieren een goede correlatie gevonden tussen de oestradiol-17 β gehalten in bloed en urine. Hierbij ligt het gehalte in urine 15-20 maal hoger dan het gehalte in het plasma.

Het toedienen van testosteron propionaat heeft nauwelijks effect op het natuurlijk gehalte van testosteron-17 β in urine. In bloed werd slechts op één moment tijdens de proefperiode (op de 16e dag) een verhoogd gehalte aan testosteron-17 β gevonden.

De resultaten van het NMR onderzoek naar de samenstelling van de urine van de bokjes laten zien dat de meeste behandelde dieren hoge lactaat/creatine (L/C) ratio's in de urine hebben, vergeleken met de controledieren. Beta-agonisten hebben een omgekeerd effect op L-lactaat en creatine, d.w.z. het L-lactaatgehalte stijgt, terwijl het creatinegehalte daalt.

Deze bevindingen kunnen verklaard worden uit het fysiologisch effect van deze stoffen. Beta-agonisten verlagen de eiwit afbraak en verhogen de thermogenese. Creatine wordt aangetroffen in spierweefsel en is belangrijk om energie biochemisch beschikbaar te maken voor spiercontractie. Meer spierweefsel betekent dus een hogere behoefte aan creatine, dit leidt tot een verminderde uitscheiding van creatine in het bloed en zo ook in de urine. De hogere lactaatproductie is geassocieerd met thermogenese. L-lactaat (een eindproduct van de glycolyse) wordt uitgescheiden in het bloed en in de lever weer omgezet in glucose. Hogere gehalten L-lactaat in het bloed betekenen automatisch ook hogere gehalten in de urine.

Opmerkelijk was dat ook testosteron propionaat en oestradiol-17 β benzoaat de L/C ratio verhoogden, op dezelfde manier als beta-agonisten.

Dit betekent dat een verhoogde L/C ratio in de urine indicatief kan zijn voor het gebruik van een wijde range groeibevorderende stoffen. Dit kan omdat het fysiologisch effect van verhoogde groei met deze screeningsmethode wordt gemeten.

De natuurlijke spreiding van de L/C ratio kan leiden tot vals positieve en vals negatieve resultaten. Dit probleem kan worden opgevangen door het gemiddelde van een behandelingsgroep te nemen.

De chemische samenstelling van het spierweefsel, opgesplitst in vocht, eiwit en vetgehalte, veranderde onder invloed van het gebruik van clenbuterol. Het gehalte aan intramusculair vet nam af bij alle groepen waarbij clenbuterol was gebruikt. Eiwit- en vochtgehalten werden door geen van de behandelingsmethoden beïnvloed.

Voor een juiste evaluatie van de resultaten van dit experiment en de waarde van de geitebok als modeldier voor het vleeskalf, is het noodzakelijk te beschikken over de resultaten van de recent gehouden kalverexperimenten (ILOB-TNO en IVO-DLO). Deze resultaten worden eind 1992 verwacht.

Samenvattend luiden de conclusies:

- wat betreft groei, voederconversie en spier- en vetaanzet is de geitebok een goed modeldier voor het kalf
- gebruik van clenbuterol bij de geit leidt tot zwaardere spieren en minder vetaanzet
- gebruik van clenbuterol leidt tot reductie van de hoeveelheid intramusculair vet
- gebruik van clenbuterol leidt tot degeneratieve veranderingen in de geslachtsorganen, lever, pancreas en thymus
- clenbuterol veroorzaakt duidelijke degeneratieve veranderingen in de prostaat, die mogelijk als histologische screening naar beta-agonisten gebruikt kan worden
- gecombineerd gebruik van oestradiol en clenbuterol geeft gemengde effecten in de prostaat, waarbij zowel metaplasie als degeneratie waarneembaar zijn
- gebruik van clenbuterol al of niet in combinatie met oestradiol-17 β benzoaat en/of testosteronpropionaat bij de geit leidt tot een verhoging van de lactaat/creatine (L/C) ratio in de urine
- ook oestradiol-17 β benzoaat, testosteron propionaat en een combinatie van deze stoffen leiden tot een verhoogde L/C ratio in de urine, wat eventueel gebruikt kan worden als indicatie voor gebruik van groeibevorderende stoffen
- behandeling met oestradiol-17 β benzoaat gecombineerd met testosteron propionaat leidt tot lagere gewichten van de testikels en de thymus
- met clenbuterol of combinaties behandelde bokjes vertoonden clenbuterolgehalten in de urine van <3 tot 70 ng/ml
- toediening van oestradiol-17 β benzoaat geeft een duidelijke verhoging van het oestradiol-17 β gehalte in urine en plasma
- toediening van testosteronpropionaat heeft nauwelijks invloed op de gehalten aan testosteron-17 β in de urine
- bij gecombineerd gebruik van clenbuterol en oestradiol-17 β benzoaat wordt de concentratie oestradiol-17 β in de urine significant hoger dan bij gebruik van oestradiol-17 β benzoaat alleen.

LITERATUUR

Hoofdstuk 1

Frijns, L.H.M., persoonlijke mededeling 1992.

Groot, M.J.

Histological screening for illegal administration of growth promoting agents in veal calves. Proefschrift Utrecht, 1992.

Hoofdstuk 3

Groot, M.J. and C.J.M. Arts.

Histological changes in the genital tract of male veal calves after the administration of natural hormones. Arch. Lebensmittelhyg. 1991; 42: 93-96.

Groot, M.J., J.M.P. den Hartog, C.J.M. Arts, J.S. Ossenkoppele and E.Gruys.

Histological changes in the prostate of veal calves after the administration of natural hormones. Arch. Lebensmittelhyg. 1990; 41: 37-42.

Kroes, R.

Estrogen-induced changes in the genital tract of the male calf - a morphological study. Proefschrift Utrecht 1970.

Kroes, R., L.G. Huis in 't Veld, P.L. Schuller and R.W. Stephany.

Methods for controlling the application of anabolics in farm animals. In: Anabolic agents in animal production FAO/WHO Symposium, Rome. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1976, p. 192-201.

Krüskenper, H.L.

Anabolic steroids. Academic Press, New York and London 1968, p.167-183.

Martindale (The extra pharmacopoeia), 29th edition, The Pharmaceutical Press, London, 1989.

Muir, L.A., S. Wien, P.F. Duquette, G. Olson.

Effect of the beta-adrenergic L-640,033 on lipid metabolism, growth and carcass characteristics of female broiler chickens. J. Anim. Sci. 1985; 63 Suppl. 1: 231 (Abstract).

Noller, K.L. and C.R. Fish.

Diethylstilbestrol usage: Its interesting past, important present and questionable future. *Med. Clin. North. Am.* 1974; 58: 793-810.

Pruyn, F.

Oxidative stress in hepatocytes. Effects on receptor-mediated processes. Ph.D. Thesis, Amsterdam 1990.

Quirke, J.F., P. Allen, A.P. Moloney, M. Sommer, J.P. Hanrahan, W. Sheehan and J.F. Roche.

Effects of the beta-agonist cimaterol on blood metabolite and hormone concentrations, growth and carcass composition in finishing friesland steers. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 1988; 60: 128-136.

Ricks, C.A., R.H. Dalrymple, P.K. Baker and D.L. Ingle.

Use of beta-agonists to alter fat and muscle deposition in steers. *J. Anim. Sci.* 1984; 59: 1247-1255.

Hoofdstuk 4

C.J.M. Arts, e.a.

A control system for the detection of the illegal use of naturally occurring steroids in calves., ILOB rapport no. I-89-3638, Wageningen, 1989.

Diagnostics Products Corporation (DPC).

Coat-a-count total testosterone, Produktbeschrijving U 258, Los Angeles, 1988.

Diagnostics Products Corporation (DPC).

Coat-a-count oestradiol, Produktbeschrijving B 804, Los Angeles, 1990.

M.J. Groot, e.a.

Tussenrapport bokkenproef 1991: Bokken behandeld met clenbuterol, oestradiol en testosteron en combinaties van deze middelen, RIKILT-DLO, Wageningen, 1991.

W. Haasnoot, e.a.

De ontwikkeling van een multiscreeningsmethode voor β -agonisten in urine, RIKILT-DLO rapport no. 90.51, Wageningen, 1990.

W. Haasnoot, e.a.

Vergelijking van een screenings- en bevestigingsmethode voor de bepaling van β -agonisten in urine, RIKILT-DLO rapport no. 91.18, Wageningen, 1991.

L. Rinke.

Entwicklung Analytischer Methoden zur Rückstandskontrolle von β -Agonisten und Modellversuche am Mastkälbern zur beurteilung von Clenbuterolrückständen, proefschrift Ludwig-Maximilians-Universität München, 1990.

Hoofdstuk 5

Fiems, L.O.

Review : Effect of beta-adrenic agonists in animal production and their mode of action.

National Institute for Animal Nutrition

Agricultural Research Centre-Ghent

Scheldeweg 68, B-9231 Melle-Gontrode (Belgium)

Maltin, C.A. et al.

British Journal of Nutrition (63), 1990, p. 535-545

Zimmerli, U.V. and Blum, J.W.

J. Anim. Physiol. a. Anim. nutr. (63), 1990, p.157-172

Hoofdstuk 7

Berende, P.L.M and E.J. Ruitenbergh.

Modifying growth: an example of possibilities and limitations. In: World animal science I: Domestic conservation of animal resources. Elsevier, Amsterdam, Oxford, Tokyo 1983; 191-223.

Groot, M.J.

Histological screening for illegal administration of growth promoting agents in veal calves. Proefschrift Utrecht, 1992.

Hanrahan, J.P. (ed).

Beta-agonists and their effect on animal growth and carcass quality. Elseviers Applied Science, London and New York, 1987.

Kroes, R.

Estrogen-induced changes in the genital tract of the male calf - a morphological study. Proefschrift Utrecht 1970.

BIJLAGE 1.

Samenvatting RIKILT-rapport nr. 91-57.

In dit onderzoek zijn met behulp van NMR (Nuclear Magnetic Resonance) potentiële parameters (lactaat- en creatine-concentratie) gevonden in mestkalverurine, waarmee in praktijk gescreend kan worden op het gebruik van beta-agonisten. De verhouding tussen de concentraties van lactaat en creatine in urine (L/C verhouding) is indicatief hiervoor. Beide metabolieten zijn relatief eenvoudig en goedkoop direct in urine te bepalen via een enzymatische laboratoriumprocedure, die zich mogelijk ook leent voor "on site" metingen; bepaling op grote schaal in een laboratorium kan m.b.v. een autoanalyser (enkele tientallen monsters per uur). Er bestaat nu de behoefte om deze methode verder statistisch te onderbouwen en te toetsen door van een groot aantal praktijkmonsters (en monsters uit dierexperimenten) de L/C verhouding te vergelijken met het analyse resultaat op beta-agonisten.

Natuurlijke spreidingen in L/C verhoudingen kunnen er toe leiden, dat vals negatieve en vals positieve scores voorkomen. Door waarden van b.v. 5 kalveren uit een stal te middelen wordt de invloed van spreidingen grotendeels weggenomen, waardoor een betrouwbaar resultaat ontstaat. Op grond van de resultaten in dit rapport (*vide infra*; gelimiteerd aantal urines) blijkt elke willekeurige combinatie van 5 blanco-urines blanco te scoren, terwijl elke combinatie van 5 positieve urines positief scoort.

Punten van aandacht in dit onderzoek - ter verdere onderbouwing - behoren nog te zijn : de behandelingsduur, soort beta-agonist, wachttijden, "stress"-factoren, dieet e.d.

De L/C verhouding is gerelateerd aan het effect van beta-agonisten op de fysiologie van de mestkalf. Hieruit volgt, dat niet direct de beta-agonist zelf maar juist een effect van het gebruik van beta-agonisten wordt geregistreerd. Dit maakt een screeningsmethode op basis van de L/C verhouding groepselectief en niet stofselectief. Het gebruik van onbekende - nieuw op de illegale markt verschenen - stoffen kan in principe met deze methode ook opgespoord worden zonder dat eerst de verantwoordelijke stof zelf aangetoond is (dit is monitoring op nieuwe stoffen). Recente voorlopige metingen wijzen uit, dat andere natuurlijke hormonen, zoals b.v. oestradiol en testosteron, mogelijk ook de L/C verhouding beïnvloeden (zoals beta-agonisten).

De in dit rapport beschreven werkwijze om tot een screeningsmethode te komen is op vele biologisch actieve stoffen toepasbaar. Hierbij speelt NMR een essentiële rol in het zoeken naar en identificeren van screeningsparameters. Eenzelfde aanpak wordt voorgesteld voor natuurlijke hormonen.

BIJLAGE 2: Tabellen horende bij hoofdstuk 2

Tabel 1. Chronologisch overzicht vanaf de geboorte van de dieren tot en met de slachtdatum

Bijzonderheden	Hokken 1 en 2	Hokken 3 en 4	Hokken 5 en 6	Hokken 7 en 8	Hokken 9 en 10
Geboortedata	28-01	28-01	6 dieren 28-01 2 dieren 01-02	1 dier 28-01 5 dieren 01-02 2 dieren 15-02	2 dieren 15-02 5 dieren 20-02
Aanvoerdata Gewicht bij aanvoer (kg)	30-01 3,8(2,8-5,1) ^v	30-01 3,7(3,0-4,8)	30-01 en 04-02 3,6(2,8-3,9)	30-01,04-02 en 18-02 3,8(3,0-5,5)	18-02 en 22-02 3,5(2,8-4,8)
Groei van aanvoer tot begin proef (kg)	15,5	14,1	13,8	13,0	12,1
Globale poederconsump- tie tot begin van de proef (kg/dier)	17,8	18,0	17,5	16,1	16,7
Data begin proef*	26-03	27-03	29-03	03-04	17-04
Gem. leeftijd dieren bij begin proef (dagen)	57	58	59	58	57
Colestine verstreking (60 mg/d/d)	31-01/06-02	31-01/06-02	31-01/06-02 05-02/11-02	31-01/06-02 05-02/11-02 18-02/24-02	18-02/24-02 23-02/28-02
Multivitaminen (5 cc/dier)	05-02,26-02	05-02,26-02	05-02,26-02 09-02,26-02	05-02,26-02 09-02,26-02 22-02,26-02	22-02,26-02 26-02,15-03
Bisolvon	27-02/04-03	27-02/04-03	27-02/04-03		

Vervolg tabel 1.

Bijzonderheden	Hokken 1 en 2	Hokken 3 en 4	Hokken 5 en 6	Hokken 7 en 8	Hokken 9 en 10
Kaopectate en Spectam					
Prednobioted (= prednisonpreparaat)					
Kanapen	dier 11 op 22-03/ 23-03				dier 33 op 26-02 en 27-03
Behandeling met dier- geneesmiddelen tijdens proefperiode	niet	niet	niet	niet	niet
Gezondheidstoestand tijdens proefperiode	zeer goed	zeer goed	zeer goed	zeer goed	zeer goed be- halve dier 41**
Weegdata dieren tijdens proef	25-03, 02-04, 08-04 15-04, 22-04, 23-04	26-03, 02-04, 08-04 22-04, 24-04	28-03, 02-04, 08-04 22-04, 26-04	02-04, 08-04, 22-04 29-04, 01-05	16-04, 22-04, 29-04, 06-05, 13-05/15-05
Weegtijdstippen na 1. proefbehandeling (dagen)	7-13-20-27-28	6-12-19-26-28	4-10-17-24-28	5-12-19-26-28	5-12-19-26-28
Data toediening anabole stoffen	26-02, 02-04, 09-04 en 16-04	27-03, 29-03, 03-04, 10-04 en 17-04	29-05, 05-04, 12-04 en 19-04	03-04, 10-04, 17-04 en 24-04	17-04, 24-04, 01-05 en 08-05

Tabel 2. Samenstelling kunstmelkpoeder, kalverkorrel en hooi

Kunstmelkpoeder (lammerfok)*

Berekende gehalten:

ruw eiwit	23,5%
ruw vet	22,4%
as	6,6%
calcium	1,05%
fosfor	0,71%
VEV1	1900

Babykalverkorrel

kokoschilfers	15,0%
lijnzaadschilfers	15,0%
sojabonen (getoast)	1,7%
sojaschroot	13,7%
ontsloten mais	20,0%
aardappelvezels	4,5%
bietenpulp	10,0%
luzerne	10,0%
rietmelasse	8,0%
vitamine-mineralenmengsel**	1,1%

Berekende gehalten:

VEM	940
ruw eiwit	19,7%
calcium	0,79%
fosfor	0,55%
VEV1	1013

Hooi

Berekende gehalten

droge stof	88,0%
VEM	750
verteerbaar ruw eiwit	12,5%
ruw eiwit	18,3%
ruw as	1,0%
VEV1	740

* De samenstelling van de kunstmelkpoeder is bij de auteurs bekend (gebruikt antibioticum 80 ppm spiramycine)

** Inclusief 0,25% CaCO₃, 0,65 Ca(H₂PO₄)₂, 0,7% NaCl en 7.500 IE vit. A, 1.500 IE vit. D en 5 IE vit. E en 12 mg Cu per kg.

Tabel 3. Materiaal van alle geitebokken welke gewogen, bemonsterd, gefixeerd en opgeslagen is voor nader onderzoek

Organen/weefsels	Gewogen	Bemonsterd voor ¹⁾ RIKILT en RUU ²⁾	Bemonsterd voor ⁴⁾ RIKILT
1. Onderhuidsvet	nee		ja
2. Spieren:			
m. longissimus lumborum en thoracis ⁴⁾	ja	RIKILT (AC, NMR en BFA)	ja
m. biceps femoris + m. gluteus superficialis	ja	RIKILT (AC en NMR)	
m. triceps brachii	ja	RIKILT (AC en NMR)	
3. Urine	nee	RIKILT (BFA)	ja
4. Lever	ja	RIKILT (BFA)	
5. Milt	nee	RUU/RIKILT (tox. 5)	ja
6. Pancreas	ja		ja
7. Long	nee		ja
8. Hart	ja		ja
9. Thymus	ja		ja
10. Schildklier ⁴⁾	ja		ja
11. Testikels ⁴⁾ + zaadblaasjes ⁴⁾	ja		ja
12. Prostaat	nee		ja
13. Bulboürethraalklieren	ja		ja
14. Nieren	ja	RIKILT (BFA)	ja
15. Bijneren	ja		ja
16. Nier- en bekkenvet	ja	RIKILT (BFA)	ja
17. Hypofyse	ja		ja
18. Parotis	ja		ja
19. Ogen ⁶⁾	nee	RIKILT (BFA)	ja
20. Bloed	nee	RIKILT (BFA)	nee

Vervolg tabel 3.

Slachtvolgorde:

hok 1 en 2 : 11, 17, 10, 20, 12 (en 6, 7, 23)
hok 3 en 4 : 19, 1, 18, 8, 4 (en 2, 14, 21)
hok 6 en 5 : 15, 16, 22, 26, 12 (en 3, 9, 27)
hok 8 en 7 : 25, 28, 30, 32, 24 (en 5, 29, 34)
hok 10 en 9 : 36, 42, 37, 38, 40 (en 33, 35)

- 1) afdelingen BFA, AC, NMR en Tox.
- 2) afdeling Farmacologie
- 3) afdeling Micro (histologisch onderzoek)
- 4) in tweevoud verzameld en gewogen
- 5) op vloeibare stikstof
- 6) eerste 5 dieren van elke slachtdatum voor RUU
- 7) 's morgens om 9.00 uur, vóór het slachten verzameld

Tabel 4. Chemisch en histologisch onderzoek uit te voeren in materiaal van de proef verzameld tijdens proef en bij het slachten

- A) Onderzoek op testosteron, oestradiol, clenbuterol en hun metabolieten: in bloedplasma, urine, lever, nier, niervet, spier (m. longissimus lumborum en thoracis).
- B) Onderzoek op clenbuterol: in oogvocht.
- C) Onderzoek op drogestof, vet en eiwit in de volgende spieren: m. biceps femoris, m. longissimus lumborum en thoracis en m. triceps brachii.
- D) Onderzoek op energierijke fosfaten en mogelijk op andere stoffen of cel(weefsel)typen m.b.v. NMR: in de m. longissimus lumborum en thoracis en als daartoe aanleiding is zullen ook de 2 onder C genoemde spieren nader onderzocht worden.
- E) Metaboliëtoprofiëlering m.b.v. NMR in urine en spier (m. longissimus)
- F) Onderzoek op microsomen en de totale cytochroom P-450 enzymactiviteit (EROD en PROD): in de lever.
- G) Onderzoek op de cytochrome P-450 activiteit bepaald t.o.v. eiwit, sulfadimidine, ethylmorphine, testosteron, TMP/AMP, mRNA/cDNA probes: in de lever van de dieren uit de proefgroepen 2, 3, 5 en 7.
- H) Onderzoek op paraffine- en cryostaat coupes met m.b.v. de onderstaande histologische technieken in diverse weefsels en organen:
- diverse histochemische kleuringen betreffende morfologie (o.a. HE, WvG, AB/PAS, PAS, diastase-PAS, DMABR, PPB, FOUCHET, MT, ORO, Ca-lip);
 - immunohistochemische kleuringen van hormoonreceptoren voor androgenen, progesteron en oestradiol;
 - enzymkleuringen in de lever; lipase, glucose-6-fosfaatdehydrogenase, ATP-ase, iso-enzym patronen van cytochroom P-450;
 - hormoonkleuringen in endocriene organen; pancreas; insuline, glucagon en somatostatine hypofyse; ACTH, GH, PRL, FSH, LH EN TSH;
 - kleuringen van receptoren voor beta-agonisten d.m.v. peroxidase-gelabeld salbutamol en clenbuterol;
 - cytokeratinepatronen in de geslachtsorganen;
 - endogene opiaten (beta-endorphin, leu-enkephalin en met-enkephalin) in de bijnier, hypofyse en hypothalamus.
- I) Chemisch onderzoek naar haemoglobine (tweemaal), thyroxine (vrije T4), cortisol, totaal lipiden, cholesterol, creatinine, ureum, gamma-glutamyltransferase (γ -GT), aspartaat aminotransferase (ASAT), alanine aminotransferase (ALAT), lactaat dehydrogenase (LHH) en alkalische fosphatase (ALP) in bloed.

Tabel 5. Voeropname per hok (in kg per dier)

Hokken	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Behandeling:	-	clenb.	-	clenb.	clenb.	-	clenb.	-	clenb.	-
Beigndatum: wegen dieren/ voer behandeling dieren	25-03	25-03	26-03	26-03	28-03	28-03	02-04	02-04	16-04	16-04
	26-03	26-03	27-03	27-03	29-03	29-03	03-04	03-04	17-04	17-04
Periode:				Kunstmelkpoeder						
0-ca 1 week	3,77	3,20	2,16	2,52	1,07	1,59	2,19	1,85	2,22	2,08
0-ca 2 weken	8,26	6,36	5,07	5,96	3,64	4,91	4,91	4,39	5,86	5,59
0-ca 3 weken	13,13	9,41	8,58	9,38	6,39	8,21	8,09	7,08	9,87	8,76
0-ca 4 weken	17,80	13,12	12,00	12,23	8,94	12,07	11,41	9,56	13,59	12,29
0-slachten	18,52	13,84	13,07	13,36	10,53	14,59	12,55	10,54	14,80	13,43
				Kalverkorrel						
0-ca 1 week	0,02	0,10	0,15	0	0,15	0,15	1,00	0,90	0,46	0,32
0-ca 2 weken	0,18	0,48	0,75	0,15	1,00	0,40	2,68	2,08	0,47	0,60
0-ca 3 weken	0,24	1,24	1,05	0,20	2,05	1,22	4,00	3,30	1,03	0,85
0-ca 4 weken	0,44	1,71	1,45	0,45	3,20	1,98	5,25	4,55	1,77	1,38
0-slachten	0,44	1,86	1,60	0,52	4,18	2,32	5,92	5,22	2,07	1,60
				Hooi						
0-ca 1 week	0,50	0,28	0,30	0,62	1,30	0,80	0,82	0,95	0,83	0,88
0-ca 2 weken	0,60	0,52	0,65	1,88	1,82	1,72	1,78	2,08	1,77	2,08
0-ca 3 weken	0,98	1,35	1,60	2,92	3,08	2,60	3,48	3,38	2,77	3,25
0-ca 4 weken	1,40	1,98	2,88	4,18	4,22	3,90	5,10	5,08	4,00	4,32
0-slachten	1,40	1,98	3,30	4,38	5,60	4,70	5,70	5,88	4,37	4,55

Vervolg tabel 5.

Hokken	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
				Energieopname (VEVI x 10 ³)						
0-ca 1 week	7,6	6,4	4,5	5,2	3,1	3,8	5,8	5,1	5,3	4,9
0-ca 2 weken	16,3	13,0	10,9	12,9	9,3	11,0	13,4	12,0	12,9	12,8
0-ca 3 weken	25,9	20,1	18,6	20,2	16,5	18,8	22,0	19,3	21,8	19,9
0-ca 4 weken	36,2	28,1	26,4	26,8	23,4	27,8	30,9	26,5	30,6	27,9
0-slachten	36,7	29,6	28,9	28,2	28,4	33,5	34,1	29,7	33,5	30,5

Tabel 6. Voeropname per proefgroep (in kg per dier)

Proefgroepen	1	2	3	4	5	6	7	8
Behandeling	-/-	-/clenb.	E/-	E/clenb.	T/-	T/clenb.	E+T/-	E+T/clenb.
Periode:								
0-ca 1 week	2,29	2,24	2,29	2,24	2,29	2,24	2,29	2,25
0-ca 2 weken	5,64	5,35	5,64	5,35	5,64	5,35	5,64	5,22
0-ca 3 weken	9,15	8,63	9,15	8,63	9,15	8,63	9,15	8,32
0-ca 4 weken	12,74	11,86	12,74	11,86	12,74	11,86	12,74	11,42
0-slachten	14,03	13,02	14,03	13,02	14,03	13,02	14,03	12,57
				Kunstmelkpoeder				
0-ca 1 week	0,31	0,33	0,31	0,33	0,31	0,33	0,31	0,31
0-ca 2 weken	0,80	0,94	0,80	0,94	0,80	0,94	0,80	1,08
0-ca 3 weken	1,33	1,70	1,33	1,70	1,33	1,70	1,33	1,87
0-ca 4 weken	1,96	2,48	1,96	2,48	1,96	2,48	1,96	2,65
0-slachten	2,24	2,91	2,24	2,91	2,24	2,91	2,24	3,12
				Kalverkorrel				
0-ca 1 week	0,69	0,77	0,69	0,77	0,69	0,77	0,69	0,76
0-ca 2 weken	1,43	1,55	1,43	1,55	1,43	1,55	1,43	1,50
0-ca 3 weken	2,36	2,72	2,36	2,72	2,36	2,72	2,36	2,71
0-ca 4 weken	3,52	3,90	3,52	3,90	3,52	3,90	3,52	3,87
0-slachten	3,97	4,41	3,97	4,41	3,97	4,41	3,97	4,42
				Hooi				

Vervolg tabel 6.

Proefgroepen	1	2	3	4	5	6	7	8
Behandeling	-/-	-/clenb.	E/-	E/clenb.	T/-	T/clenb.	E+T/-	E+T/clenb.
	Energieopname (VEVI $\times 10^{-3}$)							
0-ca 1 week	5,2	5,2	5,2	5,2	5,2	5,2	5,2	5,2
0-ca 2 weken	12,6	12,3	12,6	12,3	12,6	12,3	12,6	12,1
0-ca 3 weken	20,9	20,1	20,9	20,1	20,9	20,1	20,9	19,7
0-ca 4 weken	29,0	28,0	29,0	28,0	29,0	28,0	29,0	27,2
0-slachten	31,9	30,8	31,9	30,8	31,9	30,8	31,9	30,3

Opm. De voeropname per dier per proefgroep is uit de hokgemiddelden berekend

* De VEVI-waarden van de gevoerde produkten zijn die waarden die gelden voor herkauwers. Omdat een (groot) gedeelte van de kunstmelk direct in de lebmaag gekomen is zijn de opgegeven VEVI-waarde voor kunstmelkpoeder te laag. Voor het hier gebruikte overzicht is de waarde met 5% verhoogd t.o.v. de waarde voor herkauwers

Tabel 7. Gewichten per dier per hok en de clenbuterolopname per hok en per kg lichaamsgewicht

	Hok 1	Hok 2	Hok 3	Hok 4	Hok 5	Hok 6	Hok 7	Hok 8	Hok 9	Hok 10
Clenbuterol	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-
Begingewicht	19,2	19,3	17,8	17,7	17,6	17,3	16,7	16,9	15,4*	16,0
Gewicht:										
na ca 1 week	22,2	21,7	19,2	19,6	18,5	18,9	18,2	18,1	17,1	17,7
na ca 2 weken	24,7	23,2	20,8	21,3	20,4	20,7	20,0	20,0	19,1	20,1
na ca 3 weken	27,0	25,2	22,3	23,4	22,4	22,5	22,5	21,4	21,3	21,4
na ca 4 weken	29,2	27,0	24,2	25,4	24,3	24,7	24,1	22,8	23,3	23,7
bij slachten	29,6	27,4	24,7	25,7	25,8	26,1	25,0	23,8	23,6	24,4
Clenbuterolopname in mcg per hok en per kg lichaamsgewicht (gem. van 4 en 3 dieren (hok 9))										
	mcg	mcg/kg 1.g	mcg	mcg/kg 1.g	mcg	mcg/kg 1.g	mcg	mcg/kg 1.g	mcg	mcg/kg 1.g
Periode										
0-ca 1 week	1109	9,8	-	825	454	10,0	862	11,0	873	11,9
0-ca 2 weken	2684	10,0	-	2248	1807	10,0	2145	10,2	2086	10,5
0-ca 3 weken	4422	10,2	-	3753	3254	9,9	3557	9,8	3439	10,1
0-ca 4 weken	6195	10,1	-	5410	4840	9,8	5144	9,9	4994	10,1
0-slachten**	6600	10,1	-	6047	5943	9,9	5748	9,9	5583	10,2

Opmerkingen: 1) Het gemiddelde begingewicht van alle dieren was: 17,4 kg

Het gemiddelde eindgewicht van alle dieren was : 25,6 kg

2) De gemiddelde clenbuterolopname over de gehele proefperiode was 10,0 ug per kg lichaamsgewicht (clenbuterol per dag/gem. lich.gew. d.i. 29921 mcg/5x7: (25,5 + 17,3)/2)

3) De gemiddelde clenbuterolopname per week was zeer weinig af van de nagestreefde hoeveelheid (10 mcg/kg 1.g). Deze kleine afwijkingen werden veroorzaakt doordat de groei soms iets afweek van de te verwachten groei en een klein gedeelte veroorzaakt door wat voerresten (melk) 's morgens. Gemiddeld over alle hokken en over de gehele proefperiode berekend is exact 10 mcg/kg 1.g geconsumeerd.

Vervolg tabel 7.

Opmerkingen: 4) De geconsumeerde hoeveelheid clenbuterol van de dieren van hok 9 week de eerste week wel sterk af van de 10 mcg. Dit kwam doordat dier 41 gestorven was en de klaargemaakte hoeveelheid clenbuterol-premix in de resterende dagen van de week door 3 dieren geconsumeerd werd.

* Exclusief het gestorven dier 41 (gem. 15,9 kg inclusief dier 41).

** Is exact 28 dagen.

Tabel 8. Begingewicht, eindgewicht en groei (in kg)

Proefgroepen Behandeling	1 -/-			2 -/c/enb.			3 E/-			4 E/c/enb.										
Dier	11	19	15	25	36	13	4	12	24	40	17	1	16	28	42	6	2	3	55	33
Begingewicht	20,1	17,4	16,7	16,3	17,3	20,7	16,8	16,7	16,1	15,7	20,0	17,8	16,4	17,2	14,6	19,3	17,6	16,5	17,6	14,8
Groei:																				
0-ca 1 week	2,7	1,0	1,3	1,0	1,5	1,4	2,0	1,1	1,1	1,2	4,1	0,4	1,6	1,4	1,8	2,7	2,6	0,3	0,9	1,9
0-ca 2 weken	4,6	3,4	2,8	2,7	3,8	1,7	3,8	3,6	2,5	2,7	6,9	1,7	3,8	3,1	4,3	5,1	4,8	1,4	3,4	4,4
0-ca 3 weken	7,4	5,2	4,2	4,1	4,8	3,7	5,5	5,7	3,9	4,8	9,7	3,0	5,8	4,8	4,9	7,5	7,0	2,9	6,0	7,2
0-ca 4 weken	10,1	7,5	6,9	5,7	7,8	5,7	6,7	7,9	5,7	7,4	11,9	5,1	7,7	5,7	6,7	9,4	8,6	4,1	7,6	9,5
0-slachten*	10,7	7,9	7,7	6,7	8,3	5,9	6,8	9,5	6,2	7,6	12,1	5,8	9,7	6,6	7,4	9,7	8,9	5,1	8,3	9,8
Gewicht bij slachten	30,8	25,3	24,4	23,0	25,6	26,6	23,6	26,2	22,3	23,3	32,1	23,6	26,1	23,8	22,0	29,0	26,5	21,6	25,9	24,6
Gem begingew.			17,6					17,2					17,2							17,2
Gem. groei:																				
0-ca 1 week			1,5					1,4					1,9							1,7
0-ca 2 weken			3,5					2,9					4,0							3,8
0-ca 3 weken			5,1					4,7					5,6							6,1
0-ca 4 weken			7,6					6,7					7,4							7,8
0-slachten			8,3					7,2					8,3							8,4
Gem. eindgew.			25,8					24,4					25,5							25,5

Vervolg tabel 8.

Proefgroepen Behandeling	5 T/-				6 T/clenb.				7 E+T/-				8 E+T/clenb.							
	10	18	22	30	37	7	14	9	29	35	20	8	26	32	38	23	21	27	34	41
	18,6	18,2	16,2	21,7	14,1	19,2	16,8	17,0	18,0	15,6	18,3	17,8	20,0	12,4	18,1	18,0	17,8	20,0	15,1	17,4
	3,0	3,0	1,3	1,1	1,4	2,6	1,5	1,5	1,7	2,0	2,0	1,2	2,0	1,3	2,0	3,0	1,3	0,8	2,1	+
	5,0	3,8	3,1	3,1	3,9	4,5	3,0	3,4	2,4	4,0	5,3	3,3	3,7	3,3	4,3	4,2	2,9	3,3	5,0	
	7,5	5,4	5,5	4,1	5,5	7,0	5,3	5,6	5,4	5,7	7,8	4,3	5,1	4,9	6,4	5,2	5,2	5,2	7,8	
	10,0	5,8	8,0	6,0	8,0	9,6	7,5	7,4	6,0	6,8	8,0	6,2	7,0	6,4	8,2	6,3	7,9	7,5	10,4	
	10,5	6,5	9,4	7,1	9,0	9,9	8,1	9,0	7,6	7,2	8,2	6,9	8,3	7,2	8,9	6,8	8,2	9,3	11,0	
	29,1	24,7	25,6	28,8	23,1	29,1	26,7	26,0	25,6	22,8	26,5	24,7	28,3	19,6	27,0	24,8	26,0	29,3	26,1	
			17,8				17,7					17,3				17,7				
			2,0				1,9					1,7					1,8			
			3,8				3,5					4,0					3,8			
			5,6				5,8					5,7					5,8			
			7,6				7,5					7,2					8,0			
			8,5				8,4					7,9					8,8			
			26,0				26,3					25,2					26,6			

+ Gestorven op 18-04 (gevonden: zeer hoge lichaamstemperatuur 42°C, ontstoken hartzakje; doodsoorzaak: onbekend)

Tabel 9. Gemiddelde groei en voeropname per dier per behandeling met
Clenbuterol

	Zonder Clenbuterol (gem. hokken 1,3,6,8 en 10)	Met Clenbuterol (gem. hokken 2,4,5,7 en 9)
	Groei (kg)	
0-ca 1 week	1,8(0,4-4,1)*	1,7(0,3-3,0)
0-ca 2 weken	3,7(1,7-6,9)	3,5(1,4-5,1)
0-ca 3 weken	5,9(3,0-9,7)	5,6(2,9-7,8)
0-ca 4 weken	7,5(5,1-11,9)	7,5(4,1-10,4)
0-slachten	8,3(5,8-12,1)	8,2(5,1-11,0)
	Kunstmelkpoeder (kg)	
0-ca 1 week	2,29	2,24
0-ca 2 weken	5,64	5,32
0-ca 3 weken	9,15	8,57
0-ca 4 weken	12,74	11,75
0-slachten	14,03	12,92
	Kalverkorrel (kg)	
0-ca 1 week	0,31	0,33
0-ca 2 weken	0,80	0,97
0-ca 3 weken	1,33	1,73
0-ca 4 weken	1,96	2,52
0-slachten	2,24	2,96
	Hooi (kg)	
0-ca 1 week	0,69	0,77
0-ca 2 weken	1,43	1,54
0-ca 3 weken	2,36	2,72
0-ca 4 weken	3,52	3,89
0-slachten	3,97	4,41
	VEVI ($\times 10^3$)	
0-ca 1 week	5,2	5,2
0-ca 2 weken	12,6	12,3
0-ca 3 weken	20,9	20,0
0-ca 4 weken	29,0	27,8
0-slachten	31,9	30,7

* = Gemiddeld en range

Tabel 10. Gemiddelde groei en energieopname per dier per behandeling met anabole steroïden

Behandeling	Controle	Oestradiol	Testosteron	Oestradiol/ Testosteron
Proefgroepen	(1 en 2)	(3 en 4)	(5 en 6)	(7 en 8)
Begingew. (kg)	17,4(15,7-20,7)*	17,2(14,8-20,0)	17,8(14,1-21,7)	17,5(12,4-20,0)
	Groei (kg)			
Periode:				
0-ca 1 week	1,4(1,0-2,7)	1,8(0,3-4,1)	2,0(1,3-3,0)	1,8(0,8-3,0)
0-ca 2 weken	3,2(1,7-4,6)	3,9(1,4-6,9)	3,6(2,4-5,0)	3,9(2,9-5,3)
0-ca 3 weken	4,9(3,7-7,4)	5,8(2,9-9,7)	5,7(4,1-7,5)	5,8(4,3-7,8)
0-ca 4 weken	7,2(5,7-10,1)	7,6(4,1-11,9)	7,6(5,8-10,0)	7,6(6,2-10,4)
0-slachten	7,8(5,9-10,7)	8,4(5,1-12,1)	8,4(6,5-10,5)	8,4(6,8-11,0)
Eindgewicht	25,1(20,3-30,8)	25,5(21,6-32,1)	26,2(22,8-29,1)	25,9(19,6-29,0)
	Energieopname (VEVI X10 ³)			
Periode:				
0-ca 1 week	5,2	5,2	5,2	5,2
0-ca 2 weken	12,4	12,4	12,4	12,4
0-ca 3 weken	20,5	20,5	20,5	20,3
0-ca 4 weken	28,5	28,5	28,5	28,1
0-slachten	31,4	31,4	31,4	31,1

* - Gemiddelde en range

Tabel 11. Bloedkarakteristieken

Proefgroep Behandeling Dier Parameter	1			2			7			gem.	
	19	25	36	gem.	4	24	40	gem.	8		32
	dagen na start	-/-	-/-	-/clenb.	-/clenb.	-/clenb.	-/clenb.	-/clenb.	-/clenb.	-/clenb.	-/clenb.
alkalische fosfatase (U/L)											
0*	2167	1826	1411	1801	869	1419	1329	1206	1276	1832	973
2	1656	1771	836	1421	825	1374	1277	1159	1166	1921	1034
5	1606	1749	1489	1615	902	1350	1196	1149	1210	2090	1079
15(1)	1393	1414	968	1258	677	922	1034	878	1008	1615	761
24(3)	1271	1595	1199	1355	727	1014	1086	942	954	1602	1050
cholesterol (mmol/l)											
0	3,3	4,2	3,5	3,7	3,0	2,7	3,3	3,0	2,5	4,3	2,5
2	3,5	3,9	3,6	3,7	3,0	2,1	3,3	2,8	2,3	3,5	2,9
5	4,1	4,1	3,4	3,9	3,9	2,4	3,3	3,2	2,5	4,2	2,6
15	3,2	4,0	2,9	3,4	4,5	2,4	3,7	3,5	2,2	3,8	2,7
24	3,6	4,3	3,5	3,8	4,2	2,8	3,3	3,4	1,9	3,4	3,5
cortisol (mcmol/l)											
0	<0,02	0,04	0,03	0,03***	<0,02	<0,02	0,06	0,03	<0,02	0,02	0,05
2	0,10	0,08	0,06	0,08	<0,02	<0,02	0,05	0,02	0,06	0,09	0,04
5	0,03	0,08	0,05	0,05	0,03	<0,02	0,08	0,04	0,02	0,05	0,05
15	<0,02	0,06	0,06	0,04	0,03	<0,02	0,01	0,02	0,04	0,05	0,05
24	0,01	0,05	0,05	0,04	0,01	0,04	0,08	0,04	<0,01	0,07	0,08
creatinine (mcmol/l)											
0	47	66	65	59	56	57	56	56	62	51	63
2	53	68	54	58	60	59	60	60	64	57	61
5	58	72	76	69	61	64	70	65	67	60	72
15	61	73	67	67	74	73	81	76	71	62	70
24	59	71	69	66	86	79	76	80	74	68	85

Vervolg tabel 11.

Proefgroep Behandeling Dier Parameter	dagen na start	1			2			7					
		19	25	36	gem.	4	24	40	gem.	8	32	38	gem.
gamma glutamyl- transferase (U/l)	0	55	45	46	49	43	53	54	50	43	62	45	50
	2	54	40	36	43	40	48	57	48	41	57	48	49
	5	59	39	52	50	47	46	58	50	46	56	52	51
	15	55	44	52	50	43	44	57	48	45	53	49	49
	24	52	48	52	51	43	43	52	46	44	59	50	51
aspartaat amino- transferase (U/l)	0	63	61	60	61	61	91	65	72	64	66	81	70
	2	68	52	53	58	60	85	64	70	55	53	89	66
	5	58	66	69	64	61	73	65	66	54	54	75	61
	15	48	52	49	50	62	72	59	64	55	57	55	56
	24	57	47	78	61	59	73	52	61	57	64	90	70
alanine amino- transferase (U/l)	0	16	21	15	17	16	19	15	17	21	17	15	18
	2	14	19	16	16	17	14	16	16	18	14	14	15
	5	9	34	17	20	17	16	18	17	18	18	12	16
	15	9	20	11	13	16	18	15	16	17	17	12	15
	24	11	16	14	14	17	18	14	16	16	19	15	17
lactaat dehydro- genase (U/l)	0	980	744	680	801	721	637	630	663	678	955	753	795
	2	742	648	680	690	675	511	591	592	628	827	747	734
	5	700	661	792	718	649	493	654	599	643	894	783	773
	15	721	660	502	628	747	483	592	607	572	696	449	572
	24	534	622	735	630	594	540	572	569	544	740	698	661

Vervolg tabel 11.

Proefgroep Behandeling Dier Parameter	1			2			7					
	19	25	36	gem.	4	24	40	gem.	8	32	38	gem.
totaal lipiden (g/l)	3,6 4,0 5,3 3,6 4,7	5,9 4,6 4,6 4,6 5,5	4,4 4,9 4,3 3,6 4,2	4,6 4,5 4,7 3,9 4,8	4,1 4,0 5,5 5,1 5,3	4,3 3,2 3,8 3,3 3,8	3,9 4,5 4,0 5,2 4,3	4,1 3,9 4,4 4,5 4,5	3,2 3,6 4,5 3,0 2,6	5,7 4,0 5,0 4,3 4,6	3,3 4,2 3,4 3,5 4,7	4,1 3,9 4,3 3,6 4,0
ureum (mmol/l)	5,3 4,9 5,6 5,6 4,7	5,4 4,6 4,9 5,0 6,4	3,9 5,3 7,2 4,7 4,0	4,9 4,9 5,9 5,1 5,0	5,6 4,7 5,5 5,1 3,6	7,1 6,4 6,8 6,2 9,1	4,4 3,9 4,4 7,2 5,7	5,7 5,0 5,6 6,2 6,1	4,8 4,9 3,6 5,8 3,8	3,8 3,1 3,7 3,3 3,6	4,9 5,3 6,6 6,5 5,4	4,5 4,4 4,6 5,2 4,3
vrije thyroxine (T ₄) (pmol/l)	26,7 24,5 20,8 24,0 24,7	20,7 24,6 23,9 21,3 26,6	23,7 20,4 14,8 - 14,1	23,7 23,2 19,8 22,6 21,8	33,6 29,3 20,6 23,1 26,0	28,6 24,5 24,3 22,2 23,3	27,0 14,6 21,0 - 22,3	29,7 22,8 22,0 22,6 23,9	27,0 26,7 35,2 21,3 31,6	20,4 19,2 17,4 18,7 17,6	28,2 20,2 16,8 - 16,9	25,2 22,0 23,1 20,0 22,0
hemoglobine (mmol/l) voor aanvang proef voor einde proef	7,2 7,2	7,8 8,3	5,5 7,6	6,8 7,7	5,4 6,2	6,9 6,9	6,7 7,4	6,3 6,8	6,8 7,7	5,8 6,9	5,7 7,5	6,1 7,4

Opmerking 1) Het gemiddelde Hb-gehalte voor de aanvang van de proef was voor de hokken 1 t/m 10 resp. 7,0, 7,7, 7,5, 6,6 6,8, 7,4, 6,8, 7,1, 6,3 en 5,4

2) Het gemiddelde Hb-gehalte tegen het einde van de proef was voor de hokken 1 t/m 10 resp. 8,3, 8,2, 8,1, 7,6, 7,8, 8,0, 7,8, 8,1, 7,4 en 7,7

3) Het gemiddelde Hb-gehalte tegen het einde van de proef was voor de proefgroepen zonder en met clenbuterol resp. 8,0 en 7,8

vervolg tabel 11.

- * Dagen na het instellen van de (eerste) proefbehandeling d.w.z. injecteren met anabole stoffen en het begin van de clenbuterol verstrekking. Tussen haakjes het aantal dagen na de 2. resp. 4. injectie met anabole stoffen
- ** Exclusief dier 41
- *** Bij een waarde van $<0,02$ voor de berekening van het gemiddelde 0,01 genomen
- v Inclusief dier 35. Is gemiddelde van de waarden van de dieren 21, 34 en 35 en daarna dit gemiddelde gesommeerd met die van de groep 2 en gedeeld door 2
- vv Inclusief dier 35. Is gemiddelde van de waarden van de dieren 21, 34 en 35 en daarna dit gemiddelde gesommeerd met die van groep 7 en gedeeld door 2

Tabel 11a. Gemiddelde waarden van de bloedkarakteristieken per dier en per per behandeling met clenbuterol (onafhankelijk van de behandeling met natuurlijke hormonen).

Proefgroep Behandeling Dier		Zonder clenb. (gem. gr. 1 en 7)	Met clenb. (gem. gr. 2 en 8)*
Parameter	dagen na start		
alkalische fosfatase (U/L)	0	1580(973-2167)	1384(440-1639)
	2	1398(836-1921)	1221(825-1383)
	5	1538(1079-2090)	1399(902-2332)
	15(1)	1193(761-1414)	1124(677-2002)
	24(3)	1278(954-1602)	1142(582-2056)
cholesterol (mmol/l)	0	3,4(2,5-4,3)	3,3(2,7-3,6)
	2	3,3(2,3-3,9)	2,9(2,1-3,7)
	5	3,5(2,5-4,2)	3,5(2,4-4,0)
	15	3,2(2,2-4,0)	3,6(2,4-4,5)
	24	3,4(1,9-4,3)	3,6(2,8-4,2)
cortiso (mcmol/l X10 ⁻²)	0	3(1-5)	3(1-6)
	2	7(4-10)	2(1-5)
	5	4(2-8)	4(1-8)
	15	4(1-6)	4(1-9)
	24	4(1-8)	4(1-8)
creatinine (mcmol/l)	0	59(47-66)	58(56-62)
	2	60(53-68)	60(53-67)
	5	67(58-76)	64(56-74)
	15	68(61-73)	73(62-83)
	24	71(59-85)	77(68-86)
gamma glutamyltransferase (U/l)	0	50(43-62)	52(43-56)
	2	46(36-57)	49(40-57)
	5	50(39-59)	50(37-59)
	15	50(44-55)	47(36-57)
	24	51(44-59)	48(37-63)
aspartaat aminotransferase (U/l)	0	66(60-81)	74(61-91)
	2	62(52-89)	65(40-85)
	5	62(54-75)	66(59-76)
	15	53(48-57)	64(59-72)
	24	66(47-90)	64(49-85)

Vervolg tabel 11a.

Proefgroep		Zonder clenb.	Met clenb.
Behandeling		(gem. gr. 1 en 7)	(gem. gr. 2 en 8)*
Dier			
Parameter	dagen na start		
alanine amino-transferase (U/l)	0	18(15-21)	16(15-19)
	2	16(14-19)	16(14-17)
	5	18(9-34)	17(15-18)
	15	14(9-20)	17(15-19)
	24	16(11-19)	17(14-21)
lactaat dehydrogenase (U/l)	0	798(768-955)	740(630-897)
	2	712(628-827)	671(511-880)
	5	746(643-894)	760(493-943)
	15	600(502-721)	624(483-747)
	24	646(534-740)	620(540-707)
totaal lipiden (g/l)	0	4,4(3,2-5,9)	4,2(3,9-4,3)
	2	4,2(3,6-4,9)	3,8(3,0-5,2)
	5	4,5(3,4-5,0)	4,7(3,8-5,5)
	15	3,8(3,0-4,6)	4,6(3,3-5,2)
	24	4,4(2,6-5,5)	4,4(3,8-5,3)
ureum (mmol/l)	0	4,7(3,8-5,4)	5,7(4,4-7,1)
	2	4,6(3,1-5,3)	4,8(3,0-6,4)
	5	5,2(3,6-7,2)	4,6(4,0-6,8)
	15	4,8(3,3-6,5)	5,1(4,1-7,2)
	24	4,6(3,6-6,4)	4,8(3,6-9,1)
vrije thyroxine (T ₄) (pmol/l)	0	24,4(20,4-28,2)	26,4(20,6-33,6)
	2	22,6(19,2-26,7)	20,8(14,6-29,3)
	5	21,4(14,8-25,2)	22,0(21,0-24,3)
	15	21,3(18,7-24,0)	19,6(15,2-23,1)
	24	21,9(14,1-31,6)	22,0(19,1-26,0)
hemoglobine (mmol/l)	vóór aanvang proef	6,4(5,5-7,8)	6,2(5,4-6,9)
	vóór einde proef	7,6(6,9-8,3)	7,2(6,2-7,8)

Tabel 12. Gemiddelde waarden van de bloedkarakteristieken per dier en per behandeling met anabole stoffen (onafhankelijk van clenbuterol verstrekking).

Behandeling proefgroepen Parameter	dagen na behandeling	Controle (1 en 2)	Oest./Test. (7 en 8)*
alkalische fosfatase (U/l)	0	1504(869-2167)	1461(973-1639)
	2	1290(825-1771)	1328(1034-1921)
	5	1342(902-1749)	1555(944-2332)
	15(1)	1001(677-1414)	1248(761-2002)
	24(3)	1148(727-1595)	1272(582-2056)
	cholesterol (mmol/l)	0	3,4(2,7-4,2))
2		3,3(2,1-3,9)	2,9(2,3-3,7)
5		3,6(2,4-4,1)	3,4(2,5-4,2)
15		3,4(2,4-4,5)	3,3(2,2-4,0)
24		3,6(2,8-4,3)	3,3(1,9-4,1)
cortisol (mcmol/l X10 ⁻²)		0	3(1-6)
	2	5(1-10)	4(1-9)
	5	4(1-8)	4(2-5)
	15	3(1-6)	6(2-9)
	24	4(1-8)	4(1-8)
	creatinine (mcmol/l)	0	58(47-66)
2		59(53-68)	61(53-67)
5		67(58-76)	65(56-74)
15		72(61-81)	69(62-83)
24		73(59-86)	75(68-85)
gamma glutamyltransferase (U/l)		0	50(43-55)
	2	46(36-57)	48(41-57)
	5	50(39-59)	47(37-59)
	15	49(43-57)	47(36-54)
	24	49(43-52)	50(37-63)
	aspartaat aminotransferase (U/l)	0	66(60-91)
2		64(52-85)	63(40-89)
5		65(58-73)	64(54-76)
15		57(48-72)	60(55-68)
24		61(47-78)	68(49-90)
alanine aminotransferase (U/l)		0	17(15-21)
	2	16(14-19)	15(14-18)
	5	18(9-34)	16(12-18)
	15	14(9-20)	16(12-19)
	24	15(11-18)	18(15-21)

Vervolg tabel 12.

Behandeling proefgroepen Parameter	dagen na behandeling	Controle (1 en 2)	Oest./Test. (7 en 8)*
lactaat dehydrogenase (U/l)	0	732(630-980)	806(678-955)
	2	641(511-742)	742(628-880)
	5	658(493-792)	847(643-943)
	15	618(502-747)	606(449-696)
	24	600(534-735)	666(544-740)
	totaal lipiden (g/l)	0	4,4(3,6-5,9)
2		4,2(3,2-4,9)	3,8(3,0-4,2)
5		4,6(3,8-5,5)	4,7(3,4-5,2)
15		4,2(3,3-5,2)	4,1(3,0-4,8)
24		4,6(3,8-5,5)	4,2(2,6-5,0)
ureum (mmol/l)		0	5,3(3,9-7,1)
	2	5,0(3,9-6,4)	4,2(3,1-5,3)
	5	5,8(4,4-7,2)	4,4(3,6-6,6)
	15	5,6(4,7-7,2)	4,9(3,3-6,5)
	24	5,2(3,6-9,1)	4,1(3,6-5,4)
	vrije thyroxine (T ₄) (pmol/l)	0	26,7(20,7-33,6)
2		21,6(14,6-29,3)	20,4(18,3-26,7)
5		18,4(14,8-24,3)	22,5(17,4-35,2)
15		22,6(21,3-24,0)	18,3(15,2-21,3)
24		22,8(14,1-26,6)	21,1(17,6-31,6)
hemoglobine (mmol/l) vóór aanvang proef voor einde proef			6,6(5,4-7,8)
		7,2(6,2-8,3)	7,5(6,9-7,8)

* - Inclusief dier 35 (groep 6)

Tabel 13. Gewichten van organen en weefsels in grammen en t.o.v. levend gewicht op slachtdatum

Proefgroepen Behandeling	1 controle						2 c/enb.						3 E/-				
	11	19	15	25	36		13	4	12	24	40		17	1	16	28	42
Gewicht einde Proef (kg)	30,8	25,3	24,4	23,0	25,6		26,6	23,6	26,2	22,3	23,3		32,1	23,6	26,1	23,8	22,0
m. longissimus ¹⁾	381 1,24	300 1,19	328 1,34	308 1,34	341 1,33		362 1,36	358 1,52	409 1,56	314 1,41	340 1,46		399 1,24	310 1,31	335 1,28	298 1,25	279 1,27
m. biceps	171 0,56	192 0,76	175 0,72	148 0,64	199 0,78		196 0,74	209 0,89	220 0,84	192 0,86	185 0,79		227 0,71	171 0,72	199 0,76	162 0,68	166 0,75
m. triceps	159 0,52	157 0,62	145 0,59	139 0,60	151 0,59		152 0,57	158 0,67	159 0,61	157 0,70	146 0,63		178 0,55	140 0,59	138 0,53	151 0,63	133 0,60
nier/bekkenvet	1004 3,26	683 2,70	760 3,11	463 2,01	510 1,99		342 1,29	621 2,63	398 1,52	174 0,78	305 1,31		852 2,65	382 1,62	708 2,71	495 2,08	315 1,43
lever	726 2,36	565 2,23	583 2,39	518 2,25	543 2,12		536 2,02	385 1,63	570 2,18	454 2,04	500 2,15		614 1,91	423 1,79	706 2,70	492 2,07	468 2,13
nier ¹⁾	77 0,25	84 0,33	64 0,26	46 0,20	52 0,20		47 0,18	50 0,21	52 0,20	46 0,21	49 0,21		72 0,22	46 0,19	62 0,23	53 0,22	41 0,19
hart	141 0,46	117 0,46	119 0,49	93 0,40	132 0,52		109 0,41	101 0,43	107 0,41	100 0,45	118 0,51		145 0,45	106 0,45	121 0,46	108 0,45	100 0,45
thymus	84,0 0,27	68,5 0,27	149,1 0,61	65,0 0,28	92,2 0,36		0 0	84,6 0,36	55,3 0,21	56,2 0,25	83,2 0,36		93,9 0,29	0 0	67,9 0,26	21,6 0,09	54,5 0,25

Vervolg tabel 13.

Proefgroepen Behandeling Dier	1 controle				2 c.lenb.				3 E/-					
	11	19	15	36	13	4	12	24	40	17	1	16	28	42
pancreas X10 ⁻³	11,0 35,7	10,6 41,9	12,8 52,5	21,9 85,5	29,6 111,3	15,3 64,8	28,7 109,5	30,1 135,0	24,4 104,7	19,9 62,0	12,0 50,8	17,3 66,3	9,4 39,5	11,1 50,0
parotis X10 ⁻³	-	3,8 15,0	2,7 11,1	5,2 20,3	4,2 15,8	2,1 8,90	4,2 16,0	4,5 20,2	2,9 12,4	6,3 19,6	3,9 16,5	6,2 23,8	3,9 16,4	1,7 7,7
testikel ¹⁾ X10 ⁻³	30,8 100,0	32,0 126,5	27,4 112,3	30,5 119,1	30,8 115,8	34,2 144,9	38,6 147,3	35,4 158,7	19,9 85,4	26,3 81,9	31,2 132,2	29,0 111,1	37,4 157,1	16,5 75,0
zaadblaas ¹⁾ X10 ⁻³	9,2 29,9	4,8 19,0	8,6 35,2	5,9 23,0	7,8 29,3	7,7 32,6	8,1 30,9	5,8 26,0	4,4 18,9	8,4 26,2	7,0 29,7	6,9 26,4	7,0 29,4	6,6 30,2
schildklier ¹⁾ X10 ⁻³	0,51 1,66	0,72 2,85	0,65 2,66	0,76 2,95	0,62 2,33	0,74 3,14	0,64 2,44	0,73 3,27	0,89 3,82	0,90 2,80	-	0,45 1,72	0,48 2,02	0,86 3,91
bijnier ²⁾ X10 ⁻³	0,54 1,75	0,68 2,69	0,56 2,30	0,64 2,50	0,64 2,41	0,73 3,09	0,63 2,40	0,67 3,00	0,74 3,18	0,81 2,52	0,70 2,97	0,67 2,57	0,64 2,69	0,72 3,27
hypofyse X10 ⁻³	-	0,46 1,82	0,36 1,48	- 1,65	0,35 1,32	0,28 1,19	0,33 1,26	0,23 1,03	0,31 1,33	0,45 1,40	0,33 1,40	0,39 1,49	0,34 1,43	0,30 1,36
bulboër. X10 ⁻³	-	0,44 1,74	-,69 2,83	0,86 3,36	0,84 3,16	1,45 6,14	1,03 3,93	1,12 5,02	0,44 1,89	1,19 3,71	1,07 4,53	1,72 6,59	1,05 4,41	0,76 3,45

1) Gemiddelde van 2 organen, spieren enz. schildkliergewicht van één exemplaar bij de dieren 11, 6, 22, 26, 42, 37

2) Meestal het gewicht van één, incidenteel gem. gewicht van twee exemplaren bij de dieren 17, 10, 20, 7, 12, 19

3) Correct gewicht

- Niet volledig aanwezig

Vervolg tabel 13.

4			5			6								
E/c/lenb.			T/-			T/c/lenb.								
6	2	3	5	33	10	18	22	30	37	7	14	9	29	35
29,0	26,5	21,6	25,9	24,6	29,1	24,7	25,6	28,8	23,1	29,1	26,7	26,0	25,6	22,8
426	436	321	376	375	339	337	289	292	284	358	403	396	376	346
1,47	1,65	1,49	1,45	1,53	1,16	1,36	1,13	1,01	1,23	1,23	1,51	1,52	1,47	1,52
225	234	175	237	218	210	163	180	214	182	239	216	222	196	180
0,78	0,88	0,81	0,92	0,89	0,72	0,66	0,70	0,74	0,79	0,82	0,81	0,85	0,77	0,79
187	188	147	197	157	172	143	128	176	134	167	169	180	168	150
0,64	0,71	0,68	0,76	0,64	0,59	0,58	0,50	0,61	0,58	0,57	0,63	0,69	0,66	0,66
389	467	479	270	411	757	901	706	543	567	1034	547	900	597	621
1,34	1,76	2,22	1,04	1,67	2,60	3,65	2,76	1,89	2,45	3,55	2,05	3,46	2,33	2,72
543	491	385	499	540	622	498	609	599	526	620	512	581	472	466
1,87	1,85	1,78	1,93	2,20	2,14	2,02	2,38	2,08	2,28	2,13	1,92	2,23	1,84	2,04
62	57	45	45	57	80	48	70	65	48	61	55	56	51	57
0,21	0,22	0,21	0,17	0,23	0,27	0,19	0,27	0,23	0,21	0,21	0,21	0,22	0,20	0,25
129	123	91	113	112	151	122	107	117	125	129	119	115	100	106
0,44	0,46	0,42	0,44	0,46	0,52	0,49	0,42	0,41	0,54	0,44	0,45	0,44	0,39	0,46
92,8	74,6	59,4	34,1	92,8	114,9	58,2	96,0	38,5	106,8	98,7	99,7	71,8	35,5	93,9
0,32	0,28	0,28	0,13	0,38	0,39	0,24	0,38	0,13	0,46	0,34	0,37	0,28	0,14	0,41

Vervolg tabel 13.

			4			5			6					
			E/clemb.			T/-			T/clemb.					
6	2	3	5	33	10	18	22	30	37	7	14	9	29	35
9,8	21,5	21,3	15,6	16,8	12,9	13,6	13,1	27,3	12,2	19,1	19,4	21,7	20,6	10,7
33,8	81,1	98,6	60,2	68,3	44,3	55,1	51,2	94,8	52,8	65,6	72,7	83,5	80,5	46,9
4,0	4,2	4,4	4,8	3,7	5,3	3,3	5,2	4,5	4,1	5,4	3,6	4,2	2,5	1,9
13,8	15,8	20,4	18,5	15,0	18,2	13,4	20,3	15,6	17,7	18,6	13,5	16,2	9,8	8,3
24,6	33,4	30,7	39,3	18,5	30,7	33,8	24,6	30,0	18,5	27,8	34,1	36,4	37,5	20,4
84,8	126,0	142,1	151,7	75,0	105,4	136,8	96,1	104,2	80,1	95,5	127,7	140,0	146,5	89,5
6,0	9,1	8,1	7,4	4,9	6,2	11,6	5,9	7,2	10,1	7,2	10,6	4,8	7,6	4,6
20,7	34,3	37,5	28,6	19,8	21,3	47,0	23,0	25,0	43,5	24,7	39,7	18,5	29,7	20,2
0,88	0,65	0,68	0,62	0,48	0,70	0,92	1,00	1,07	0,80	0,76	0,79	0,70	0,74	0,44
3,03	2,45	3,15	2,39	1,95	2,41	3,72	3,91	3,72	3,46	2,61	2,96	2,69	2,89	1,93
0,70	0,71	0,96	0,79	0,78	0,66	0,93	0,88	0,81	0,71	0,81	0,92	0,91	0,60	-
2,41	2,68	4,44	3,05	3,17	2,27	3,77	3,44	2,81	3,07	2,78	3,45	3,50	2,34	
0,44	0,29	0,25	0,42	0,29	0,30	0,39	0,37	0,26	0,34	0,36	0,39	0,38	0,16 ³⁾	0,38
1,52	1,09	1,16	1,62	1,18	1,03	1,58	1,45	0,90	1,47	1,24	1,46	1,46	0,62	1,67
0,83	1,91	1,32	1,83	0,72	1,87	1,07	0,58	0,98	0,69	0,81	1,78	1,11	1,51	0,79
2,86	7,20	0,61	7,07	2,93	6,43	4,33	2,27	3,40	2,99	2,78	6,67	4,27	5,90	3,46

Vervolg tabel 13.

	7			8			
	E+T/- 26	32	38	23	E+T/clemb. 21 27	34	41
20	8						
26,5	24,7	19,6	27,0	24,8	26,0	26,1	-
379	325	274	330	378	359	370	
1,43	1,32	1,40	1,22	1,52	1,38	1,42	
178	180	168	194	205	200	235	
0,67	0,73	0,86	0,72	0,83	0,76	0,90	
165	162	130	170	154	150	180	
0,62	0,66	0,66	0,63	0,62	0,58	0,69	
702	328	259	573	315	453	488	
2,65	1,33	1,32	2,12	1,27	1,74	1,87	
553	523	416	571	455	573	527	
2,09	2,12	2,12	2,11	1,83	2,20	2,02	
58	48	46	48	44	62	54	
0,22	0,19	0,23	0,18	0,18	0,24	0,21	
119	118	108	126	114	126	125	
0,45	0,48	0,55	0,47	0,46	0,48	0,48	
37,1	52,8	29,5	49,3	16,2	62,1	76,4	
0,14	0,21	0,15	0,18	0,07	0,24	0,29	

Vervolg tabel 13.

			7			8				
	20	8	E+I/- 26	32	38	23	E+I/clemb. 21	27	34	41
	14,0	32,2	21,0	16,9	26,9	12,5	23,8	19,6	17,1	
	52,8	130,4	74,2	86,2	99,6	50,4	91,5	66,9	65,5	
	6,9	4,2	4,7	3,7	4,3	4,0	2,0	3,3	4,5	
	26,0	17,0	16,6	18,9	15,9	16,1	7,7	12,3	17,2	
	25,0	28,6	32,1	12,0	23,4	31,1	25,5	32,7	13,6	
	94,3	115,8	113,4	61,2	86,7	125,4	96,2	111,6	52,1	
	6,3	8,0	7,0	3,6	8,1	8,3	9,1	8,1	4,5	
	23,8	32,4	24,7	18,4	30,2	33,5	35,0	27,6	17,2	
	0,58	0,88	0,78	0,60	1,01	0,74	0,79	0,82	0,83	
	2,19	3,56	2,76	3,06	3,74	2,98	3,04	2,80	3,18	
	0,66	0,90	0,92	0,75	0,84	0,75	0,79	0,72	0,80	
	2,49	3,64	3,25	3,83	3,11	3,02	3,04	2,46	3,07	
	0,21	0,40	0,37	0,31	0,38	0,32	0,37	0,41	0,28	
	0,79	1,62	1,31	1,58	1,41	1,29	1,42	1,40	1,07	
	0,84	0,83	1,20	0,87	0,60	1,19	1,11	1,51	0,51	
	3,17	3,36	4,24	4,44	2,22	4,80	4,27	5,15	1,95	

Tabel 14. Gemiddelde gewichten van organen en weefsels per dier per hok in grammen en relatief t.o.v. levend gewicht

Hok	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Behandeling	-	clenb.	-	clenb.	clenb.	-	clenb.	-	clenb.	-
Gewicht einde proef (kg)	29,6	27,4	24,7	25,7	25,8	26,1	25,0	23,8	23,6	24,4
m. longissimus	374 1,27	381 1,39	318 1,29	389 1,51	398 1,54	330 1,26	359 1,44	293 1,23	354 1,50	308 1,26
m. biceps	196 0,66	216 0,79	176 0,71	215 0,84	215 0,83	187 0,72	215 0,86	173 0,73	194 0,82	185 0,76
m. triceps	168 0,57	165 0,60	150 0,61	166 0,65	169 0,65	140 0,54	176 0,70	149 0,63	151 0,64	147 0,60
nier/bekkenvet	829 2,80	520 1,89	573 2,32	522 2,03	653 2,53	893 3,42	382 1,91	440 1,85	446 1,89	491 2,01
lever	629 2,12	538 1,97	502 2,03	490 1,91	534 2,07	606 2,32	488 1,95	506 2,13	502 2,13	527 2,16
nier	72 0,24	54 0,20	56 0,23	56 0,22	53 0,21	66 0,25	49 0,20	52 0,22	54 0,23	47 0,19
hart	139 0,47	120 0,44	116 0,47	117 0,46	106 0,41	116 0,46	110 0,44	106 0,45	112 0,47	121 0,49
thymus	82,5 0,28	51,9 0,19	44,9 0,18	80,2 0,31	58,8 0,23	88,1 0,34	50,6 0,20	38,6 0,16	90,0 0,38	75,7 0,31

Vervolg tabel 14.

Hok	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Behandeling	-	clenb.	-	clenb.	clenb.	-	clenb.	-	clenb.	-
pancreas	14,4	17,8	17,1	20,0	22,8	16,0	20,8	17,0	17,3	18,0
					$\times 10^{-3}$					
parotis	6,2	4,4	3,8	3,0	4,0	4,7	4,1	5,4	2,8	3,8
	21,1	16,1	15,4	11,6	15,6	18,0	16,3	22,9	12,0	15,7
					$\times 10^{-3}$					
testikel	28,2	28,6	31,4	31,8	34,6	28,3	31,4	26,8	19,6	22,2
	95,3	104,3	127,1	123,7	134,1	108,3	125,8	112,8	83,1	91,1
					$\times 10^{-3}$					
zaadblaas	7,5	7,3	7,8	9,1	7,3	7,1	6,3	5,3	4,6	7,7
	25,4	26,7	31,8	35,5	28,2	27,2	25,3	22,3	19,6	31,5
					$\times 10^{-3}$					
schildklier	0,67	0,75	0,84	0,74	0,71	0,77	0,73	0,67	0,60	0,86
	2,27	2,74	3,35	2,89	2,75	2,94	2,92	2,82	2,56	3,51
					$\times 10^{-3}$					
bijnier	0,66	0,72	0,80	0,79	0,80	0,76	0,72	0,75	0,76	0,73
	2,26	2,65	3,25	3,06	3,12	2,90	2,86	3,14	3,17	2,98
					$\times 10^{-3}$					
hypofyse	0,32	0,37	0,40	0,33	0,34	0,37	0,27	0,32	0,33	0,34
	1,10	1,34	1,60	1,29	1,33	1,43	1,09	1,36	1,40	1,40
					$\times 10^{-3}$					
bulboür.	1,30	0,92	0,85	1,56	1,24	1,05	1,24	0,98	0,65	0,73
	4,45	3,35	3,45	6,08	4,82	4,01	4,97	4,11	2,75	2,98
					$\times 10^{-3}$					

Tabel 15. Gemiddelde gewichten van organen en weefsels per dier per proefgroep in grammen en relatief t.o.v. levend gewicht

Proefgroep Behandeling	1 -/-	2 -/c/lenb.	3 E/-	4 E/c/lenb.	5 T/-	6 T/c/lenb.	7 E+T/-	8 E+T/c/lenb.
Gewicht einde proef (kg)	25,8	24,4	25,5	25,5	26,3	26,0	25,2	26,6
m. longsisimus	332 1,29	357 1,46	324 1,27	387 1,52	308 1,17	376 1,45	335 1,33	393 1,48
m. biceps	177 0,69	200 0,82	185 0,73	218 0,85	190 0,72	211 0,81	183 0,73	221 0,83
m. triceps	150 0,58	154 0,63	148 0,58	175 0,69	151 0,57	167 0,64	155 0,62	168 0,63
nier/bekkenvet	684 2,65	368 1,51	550 2,16	403 1,58	695 2,64	740 2,85	652 2,59	522 1,97
lever	587 2,28	489 2,00	541 2,12	492 1,93	571 2,17	530 2,04	518 2,06	539 2,03
nier	65 0,25	49 0,20	55 0,21	53 0,21	62 0,24	56 0,22	53 0,21	55 0,21
hart	120 0,47	107 0,44	116 0,45	114 0,45	124 0,47	114 0,44	118 0,48	120 0,45
thymus	91,8 0,36	55,9 0,25	47,6 0,19	70,7 0,28	82,9 0,32	79,9 0,31	41,7 0,17	50,8 0,19
pancreas	14,2 55,0	25,6 105,0	13,9 54,7	17,0 66,7	15,8 60,2	18,3 70,4	22,2 88,1	18,2 68,7

X10⁻³

Vervolg tabel 15.

Proefgroep Behandeling	1 -/-	2 -/c/enb.	3 E/-	4 E/c/enb.	5 T/-	6 T/c/enb.	7 E+T/-	8 E+T/c/enb.
parotitis X10 ⁻³	5,4 22,0	3,6 16,0	4,4 17,3	4,2 16,5	4,5 17,0	3,5 13,5	4,8 18,9	3,4 13,0
testikel X10 ⁻³	29,7 115,3	31,8 130,2	28,1 110,1	29,3 114,9	27,5 104,6	31,2 120,2	24,2 96,1	25,7 96,9
zaadblaas X10 ⁻³	6,4 24,7	6,8 27,9	7,2 28,2	7,1 27,8	8,2 31,2	7,0 26,8	6,6 26,2	7,5 28,2
schildklier X10 ⁻³	0,63 2,46	0,72 2,97	0,67 2,59	0,66 2,60	0,90 3,41	0,69 2,64	0,77 3,06	0,80 2,99
bijnier X10 ⁻³	0,64 2,49	0,68 2,80	0,71 2,78	0,79 3,09	0,80 3,03	0,81 3,02	0,81 3,13	0,76 2,88
hypofyse X10 ⁻³	0,40 1,55	0,30 1,23	0,36 1,42	0,34 1,33	0,33 1,26	0,33 1,28	0,33 1,33	0,34 1,30
bulboúr. X10 ⁻³	0,75 3,05	0,98 4,00	1,16 4,54	1,32 5,18	1,04 3,95	1,20 4,62	0,87 3,44	1,08 4,07

Tabel 16. Gemiddelde gewichten van organen en weefsels per dier per behandeling met clenbuterol in grammen en relatief t.o.v. levend gewicht (onafhankelijk van de behandeling met natuurlijke hormonen)

	Zonder Clenb. (gem. gr. 1,3,5 en 7)	Met Clenb. (gem. gr. 2,4,6 en 8)
Gew. einde proef (kg)	25,7(19,6-32,1)	25,6(21,6-29,3)
m. longissimus	325(274-399) 1,26	378(314-466) 1,48
m. biceps	184(163-227) 0,71	212(175-243) 0,83
m. triceps	151(130-178) 0,59	166(147-197) 0,65
nier/bekkenvet	645(259-1397) 2,51	508(174-1034) 1,99
lever	554(416-726) 2,16	512(385-620) 2,00
nier	59(41-84) 0,23	53(44-62) 0,21
hart	120(93-151) 0,46	114(91-129) 0,44
thymus	66,0(21,6-149,1) 0,26	64,3(0-99,7) 0,25
pancreas	16,5(9,4-32,2) 64,3	19,8(9,8-30,1) 77,2
parotis	4,8(1,7-9,7) 18,6	3,7(1,9-5,4) 14,4
testikel	27,4(27,0-37,4) 106,5	29,5(13,6-38,6) 115,2
zaadblaas	7,1(3,4-11,6) 27,6	7,1(4,4-10,6) 27,7
schildklier	0,74(0,45-1,07) 2,89	0,72(0,44-0,89) 2,80
bijnier	0,74(0,54-0,93) 2,88	0,76(0,60-0,96) 2,97
hypofyse	0,36(0,21-0,46) 1,38	0,33(0,16-0,44) 1,28
bulboür.	0,96(0,44-1,87) 3,72	1,14(0,44-1,78) 4,47

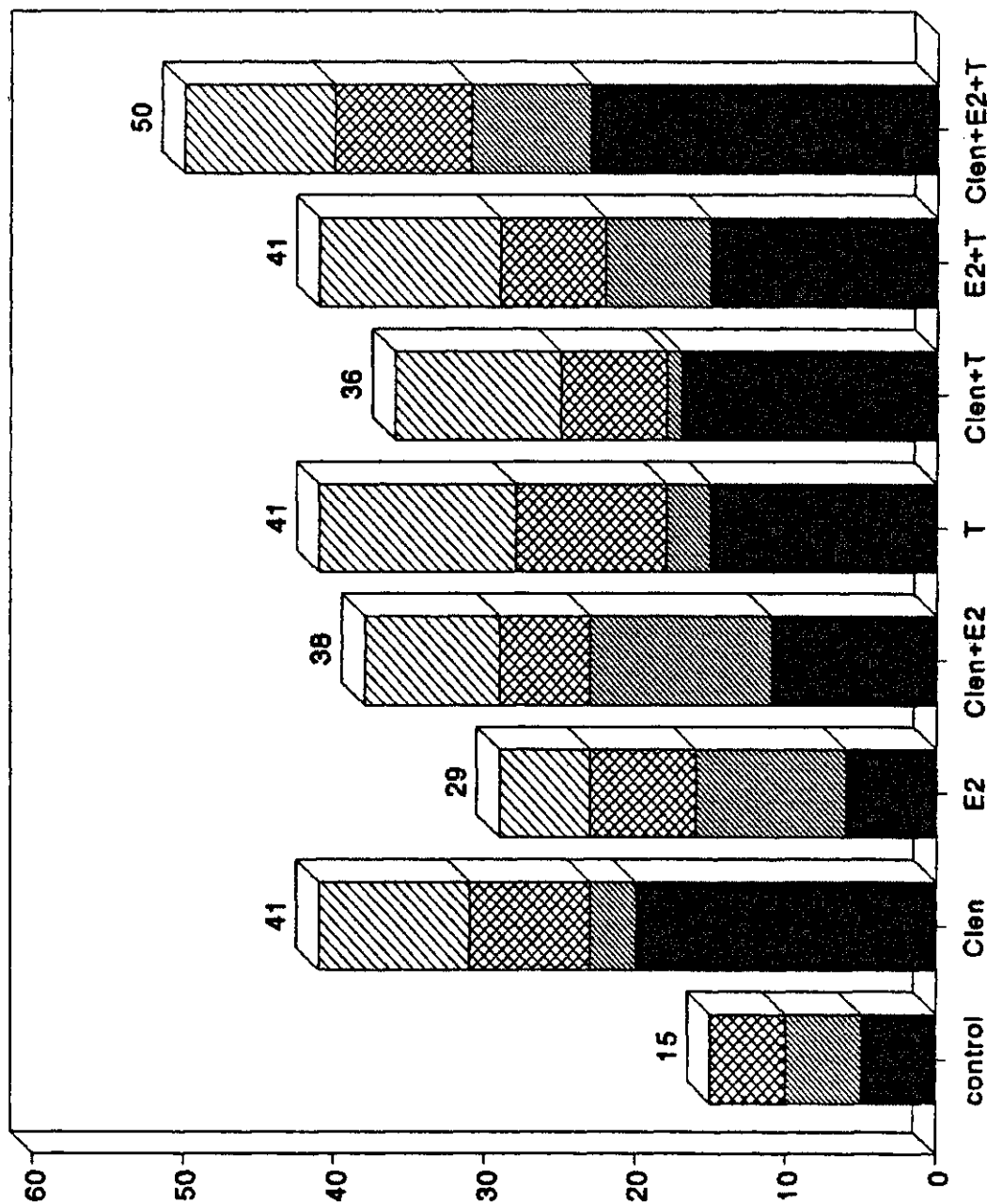
Opm. Op de 3 laatste slachtdata is ook de diameter van de buitenwand van de linker ventrikel van het hart gemeten. Voor de groepen zonder en met clenbuterol waren de gemiddelde waarden resp. 1,52 en 1,45 cm

Tabel 17. Gemiddelde gewichten van organen en weefsels per dier per behandelin met natuurlijke hormonen in grammen en relatief t.o.v. levend gewich (onafhankelijk van de behandeling met Clenbuterol)

Behandeling	Controle	Oest.	Test.	Oest./Test.
Proefgroepen	(1 en 2)	(3 en 4)	(5 en 6)	(7 en 8)
Gewicht einde proef (kg)	25,1 (22,3-30,8)	25,5 (21,6-32,1)	26,2 (22,8-29,1)	25,9 (19,6-29,3)
m. longissimus	344 (300-409)	356 (279-436)	342 (284-403)	364 (274-466)
m. biceps	1,37 188 (148-220)	1,40 202 (162-237)	1,31 200 (163-239)	1,41 202 (168-243)
m. triceps	0,75 152 (139-159)	0,79 162 (133-197)	0,77 159 (128-180)	0,78 162 (130-189)
nier/bekkenvet	0,61 526 (174-1004)	0,63 476 (270-852)	0,61 718 (543-1034)	0,62 587 (315-1397)
lever	2,10 538 (385-726)	1,87 516 (385-706)	2,74 550 (466-622)	2,27 528 (416-602)
nier	2,14 57 (46-84)	2,03 54 (41-72)	2,10 59 (48-80)	2,04 54 (44-66)
hart	0,23 114 (93-141)	0,21 115 (91-145)	0,23 119 (100-151)	0,21 119 (108-126)
thymus	0,45 73,8 (0-149,1)	0,45 59,2 (0-93,9)	0,45 81,4 (35,5-114,9)	0,46 46,2 (16,2-76,4)
pancreas	0,29 19,9 (10,6-30,1)	0,23 15,4 (9,4-21,5)	0,31 17,0 (10,7-27,3)	0,18 20,2 (12,5-32,2)
parotis	10^{-3} 79,3 4,5 (2,1-9,7)	60,6 4,3 (1,7-6,3)	65,1 4,0 (1,9-5,4)	78,0 4,1 (2,0-6,9)
testikel	10^{-3} 17,9 30,8 (19,9-38,6)	16,9 28,7 (16,5-37,4)	15,3 29,4 (18,5-37,5)	15,8 25,0 (12,0-32,7)
zaadblaas	10^{-3} 122,5 6,6 (4,4-9,2)	112,5 7,2 (4,9-9,1)	112,0 7,6 (4,6-11,6)	96,3 7,0 (3,6-9,1)
schildklier	10^{-3} 26,3 0,68 (0,51-0,89)	28,0 0,66 (0,45-0,90)	29,0 0,80 (0,44-1,07)	27,2 0,78 (0,60-1,01)
bijnier	10^{-3} 2,69 0,66 (0,54-0,74)	2,60 0,75 (0,64-0,96)	3,03 0,80 (0,60-0,93)	3,03 0,78 (0,66-0,92)
hypofyse	10^{-3} 2,63 0,35 (0,23-0,46)	2,94 0,35 (0,25-0,45)	3,05 0,33 (0,16-0,39)	3,03 0,34 (0,21-0,41)
bulboür.	10^{-3} 1,39 0,86 (0,44-1,45)	1,37 1,24 (0,72-1,83)	1,26 1,12 (0,50-1,87)	1,29 0,98 (0,51-1,51)
	10^{-3} 3,45	4,86	4,27	3,76

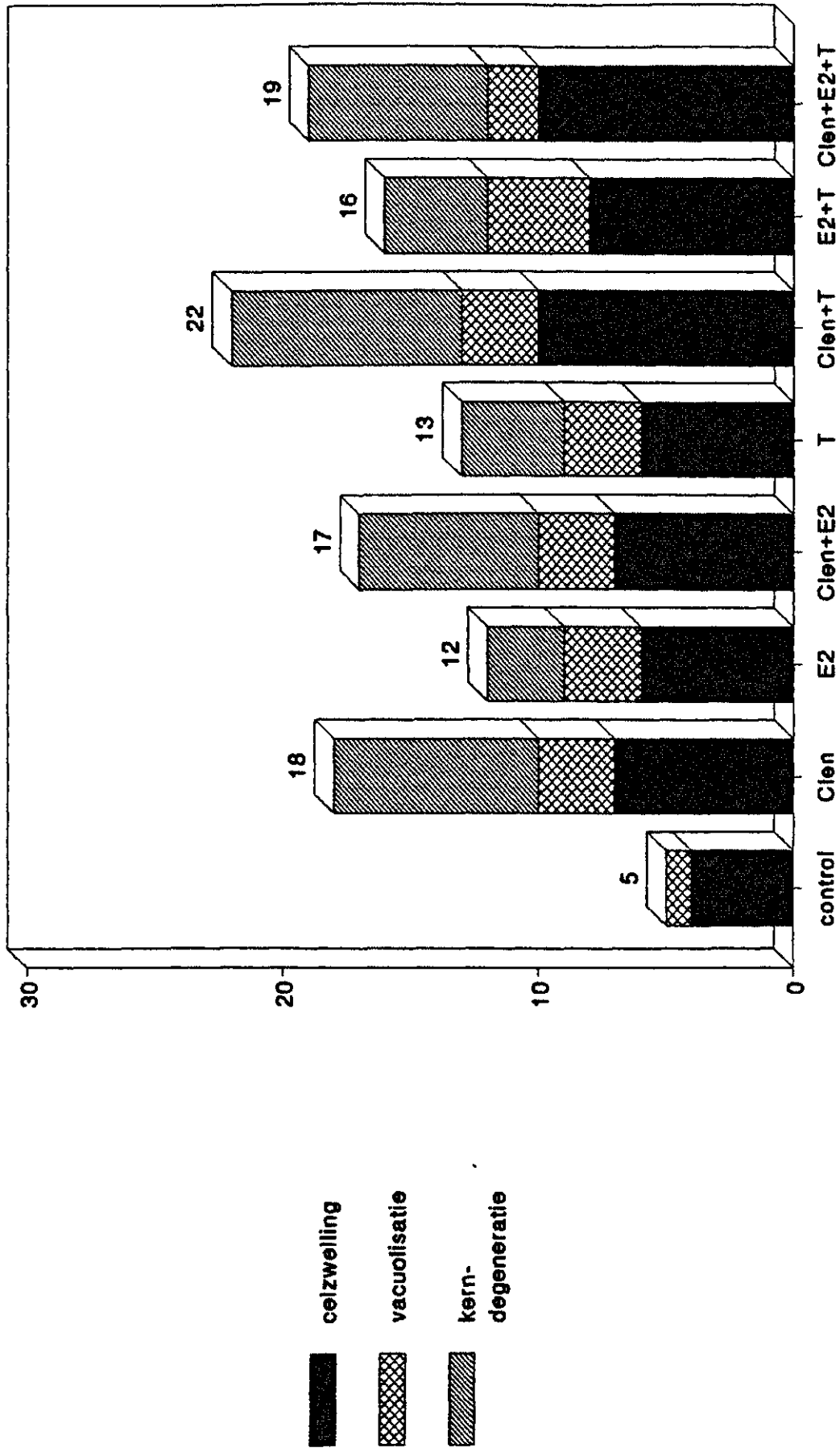
BIJLAGE 3: Figuren horende bij hoofdstuk 3

histologische veranderingen in de prostaat



Figuur 3.1

histologische veranderingen van het urethra epitheel



Figuur 3.2

BIJLAGE 4: Individuele analyseresultaten horende bij hoofdstuk 4

Tabel 4.1: Individuele gehalten aan clenbuterol 17 β -oestradiol en 17 β -testosteron in urine en plasma

diernr.	behandeld met	proefdag-nummer	datum monstername 1991	gehalten in ng/ml					
				Cb		E2		T	
				urine	plasma	urine	plasma	urine	plasma
4	Cb	0	27/3	<3	< 0.04	0.085	<0.02	3.3	4.1
4	Cb	2	29/3	25	0.32	0.07	<0.02	3.6	4.4
4	Cb	5	1/4	58	0.16	0.09	<0.02	4.3	0.9
4	Cb	9	5/4	30	0.24	0.075	<0.02	3.1	2.1
4	Cb	15	11/4	3.5	0.27	0.08	<0.02	5.9	4.0
4	Cb	24	20/4	4.5	0.28	0.095	<0.02	7.0	3.3
4	Cb	28	24/4	g.u	0.25	g.u	<0.02	g.u	0.7
12	Cb	28	26/4	26	0.38	0.35	<0.02	5.9	0.3
13	Cb	28	23/4	20	0.08	0.26	<0.02	12.8	1.4
24	Cb	0	3/4	<3	< 0.04	0.13	<0.02	6.2	3.4
24	Cb	2	5/4	8	< 0.04	0.1	<0.02	6.3	3.6
24	Cb	5	8/4	3	0.09	0.085	<0.02	4.0	2.9
24	Cb	9	12/4	3.5	0.09	0.13	<0.02	6.2	3.5
24	Cb	15	18/4	10	0.09	0.21	<0.02	12.0	0.5
24	Cb	24	27/4	<3	0.08	0.1	<0.02	1.1	0.3
24	Cb	28	1/5	4.5	0.12	0.43	<0.02	3.5	2.1
40	Cb	0	17/4	<3	< 0.04	0.085	<0.02	6.6	0.5
40	Cb	2	19/4	4.6	0.25	0.075	<0.02	7.6	1.6
40	Cb	5	22/4	20	0.31	0.08	<0.02	8.8	1.6
40	Cb	9	26/4	3	0.16	0.07	<0.02	7.7	2.2
40	Cb	15	2/5	16	0.15	0.11	<0.02	9.0	0.3
40	Cb	24	11/5	18	< 0.04	0.22	<0.02	18.9	2.6
40	Cb	28	15/5	29	0.15	0.63	<0.02	18.6	3.5
2	Cb+E ₂	28	24/4	23	0.27	18.5	<0.02	9.3	1.3
3	Cb+E ₂	28	26/4	30	0.28	27	0.02	9.9	2.3
5	Cb+E ₂	28	1/5	8	0.29	30	<0.02	8	0.2
6	Cb+E ₂	28	23/4	5	0.21	0.19	<0.02	9.9	0.3
33	Cb+E ₂	28	15/5	7	0.16	5.5	<0.02	2.0	<0.3
7	Cb+T	28	23/4	4	0.21	0.14	<0.02	6.0	0.1
9	Cb+T	28	26/4	8	0.27	0.14	<0.02	5.0	1.6

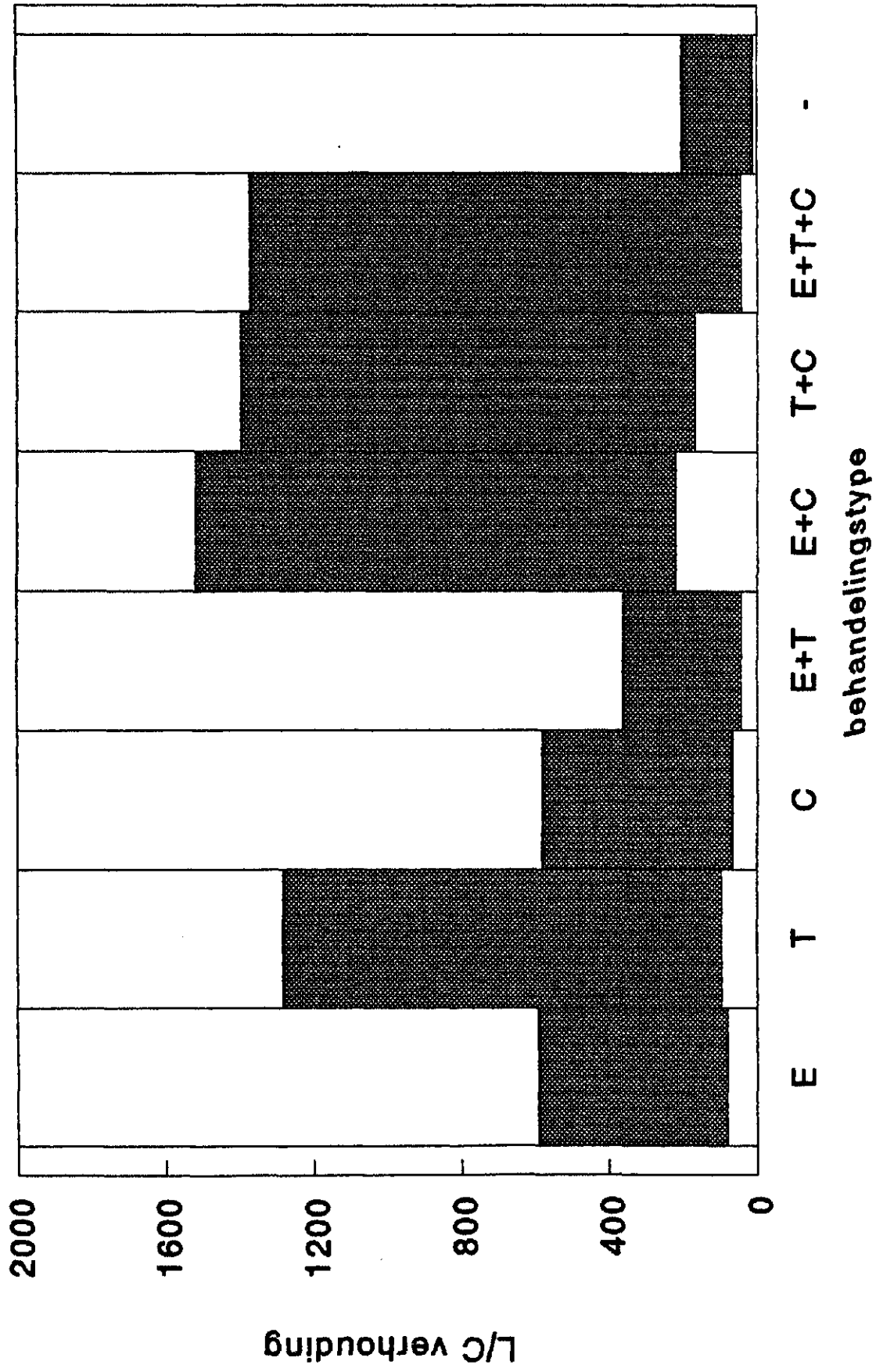
diernr.	behandeld met	proefdag-nummer	datum monstername 1991	gehalten in ng/ml					
				Cb		E2		T	
				urine	plasma	urine	plasma	urine	plasma
14	Cb+T	28	24/4	16	0.30	0.6	<0.02	3.2	0.2
29	Cb+T	28	1/5	<3	0.18	0.37	<0.02	4.6	1.9
35	Cb+T	2	19/4	4	< 0.04	0.085	<0.02	7.4	1.8
35	Cb+T	5	22/4	6	0.12	0.06	<0.02	4.2	2.2
35	Cb+T	9	26/4	6	0.10	0.045	<0.02	3.2	0.8
35	Cb+T	15	2/5	6	0.13	0.05	<0.02	4.6	8.1
35	Cb+T	24	11/5	8	0.11	0.05	<0.02	3.5	0.3
35	Cb+T	28	15/5	7	0.11	<0.02	<0.02	3.7	3.7
21	Cb+E ₂ +T	0	27/3	<3	< 0.04	0.06	<0.02	3.0	3.1
21	Cb+E ₂ +T	2	29/3	g.u.	0.06	g.u.	<0.02	g.u.	1.9
21	Cb+E ₂ +T	5	1/4	70	0.14	0.08	0.04	0.9	<0.3
21	Cb+E ₂ +T	9	5/4	12	0.23	0.12	<0.02	1.2	1.0
21	Cb+E ₂ +T	15	11/4	9	0.25	1.45	0.08	9.8	6.6
21	Cb+E ₂ +T	24	20/4	25	0.25	0.11	0.38	2.2	<0.3
21	Cb+E ₂ +T	28	24/4	4	0.15	8	<0.02	1.6	<0.3
23	Cb+E ₂ +T	28	23/4	27	0.22	180	<0.02	28	1.4
27	Cb+E ₂ +T	28	26/4	<3	0.28	42	<0.02	7.6	<0.3
34	Cb+E ₂ +T	0	3/4	<3	< 0.04	0.06	<0.02	2.2	<0.3
34	Cb+E ₂ +T	2	5/4	16	0.19	0.9	0.09	4.3	1.5
34	Cb+E ₂ +T	5	8/4	4	0.32	0.08	<0.02	0.9	<0.3
34	Cb+E ₂ +T	9	12/4	6	0.27	0.45	0.03	1.8	0.4
34	Cb+E ₂ +T	15	18/4	11	0.25	3.2	0.28	13	5.8
34	Cb+E ₂ +T	24	27/4	42	0.27	0.28	0.03	3.5	0.6
34	Cb+E ₂ +T	28	1/5	14	0.22	0.85	<0.02	1.9	<0.3
41	Cb+E ₂ +T	0	17/4	4	< 0.04	0.13	<0.02	9.5	<0.3
1	E ₂	28	24/4	g.u.	< 0.04	g.u.	<0.02	g.u.	1.5
16	E ₂	7	5/4	<3	< 0.04	11.5	<0.02	9.9	0.9
17	E ₂	28	23/4	<3	< 0.04	6.0	<0.02	1.2	<0.3
28	E ₂	28	1/5	<3	< 0.04	5.5	0.03	3.0	<0.3
42	E ₂	28	15/5	<3	< 0.04	2.0	<0.02	7.6	1.8
10	T	28	23/4	<3	< 0.04	0.15	<0.02	2.4	<0.3
18	T	28	24/4	<3	< 0.04	0.72	<0.02	2.8	0.4

diernr.	behandeld met	proefdag-nummer	datum monstername 1991	gehalten in ng/ml					
				Cb		E2		T	
				urine	plasma	urine	plasma	urine	plasma
22	T	28	26/4	<3	< 0.04	0.11	<0.02	6.2	<0.3
30	T	28	1/5	<3	< 0.04	0.09	<0.02	3.8	<0.3
37	T	28	15/5	<3	< 0.04	0.07	<0.2	2.1	2.2
8	E ₂ +T	0	26/3	<3	< 0.04	0.11	<0.02	7.2	<0.3
8	E ₂ +T	2	29/3	<3	< 0.04	2.0	0.15	10.5	3.8
8	E ₂ +T	5	1/4	<3	< 0.04	0.51	0.02	7.0	1.7
8	E ₂ +T	9	5/4	<3	< 0.04	2.12	0.06	12.3	4.2
8	E ₂ +T	15	11/4	<3	< 0.04	4.5	0.22	13.9	5.0
8	E ₂ +T	24	20/4	<3	< 0.04	0.58	0.048	6.6	0.6
8	E ₂ +T	28	24/4	<3	< 0.04	1.6	<0.02	2.5	<0.3
20	E ₂ +T	28	23/4	<3	< 0.04	7.5	<0.02	2.2	<0.3
26	E ₂ +T	28	26/4	<3	< 0.04	8.5	<0.02	4.2	0.4
32	E ₂ +T	0	3/4	<3	< 0.04	0.05	0.25	2.5	0.9
32	E ₂ +T	2	5/4	<3	< 0.04	0.87	0.03	6.9	5.7
32	E ₂ +T	5	8/4	<3	< 0.04	0.13	0.05	1.9	0.3
32	E ₂ +T	9	12/4	<3	< 0.04	0.8	0.48	5.2	2.3
32	E ₂ +T	15	18/4	<3	< 0.04	0.6	0.05	6.2	9.0
32	E ₂ +T	24	27/4	<3	< 0.04	0.44	0.02	4.3	2.7
32	E ₂ +T	28	1/5	<3	< 0.04	2.5	0.05	7.6	1.0
38	E ₂ +T	0	17/4	<3	< 0.04	0.07	<0.02	4.8	<0.3
38	E ₂ +T	2	19/4	<3	< 0.04	0.72	0.11	14.7	3.3
38	E ₂ +T	5	22/4	<3	< 0.04	0.24	<0.02	11.0	<0.3
38	E ₂ +T	9	26/4	<3	< 0.04	0.46	0.04	8.7	1.8
38	E ₂ +T	15	2/5	<3	< 0.04	3.0	0.24	28	5.8
38	E ₂ +T	24	11/5	<3	< 0.04	0.06	0.05	7.4	0.7
38	E ₂ +T	28	15/5	<3	< 0.04	2.0	<0.02	3.7	<0.3
11	controle		23/4	<3	< 0.04	0.18	<0.02	2.0	<0.3
15	controle		26/4	<3	< 0.04	0.50	<0.02	2.6	0.8

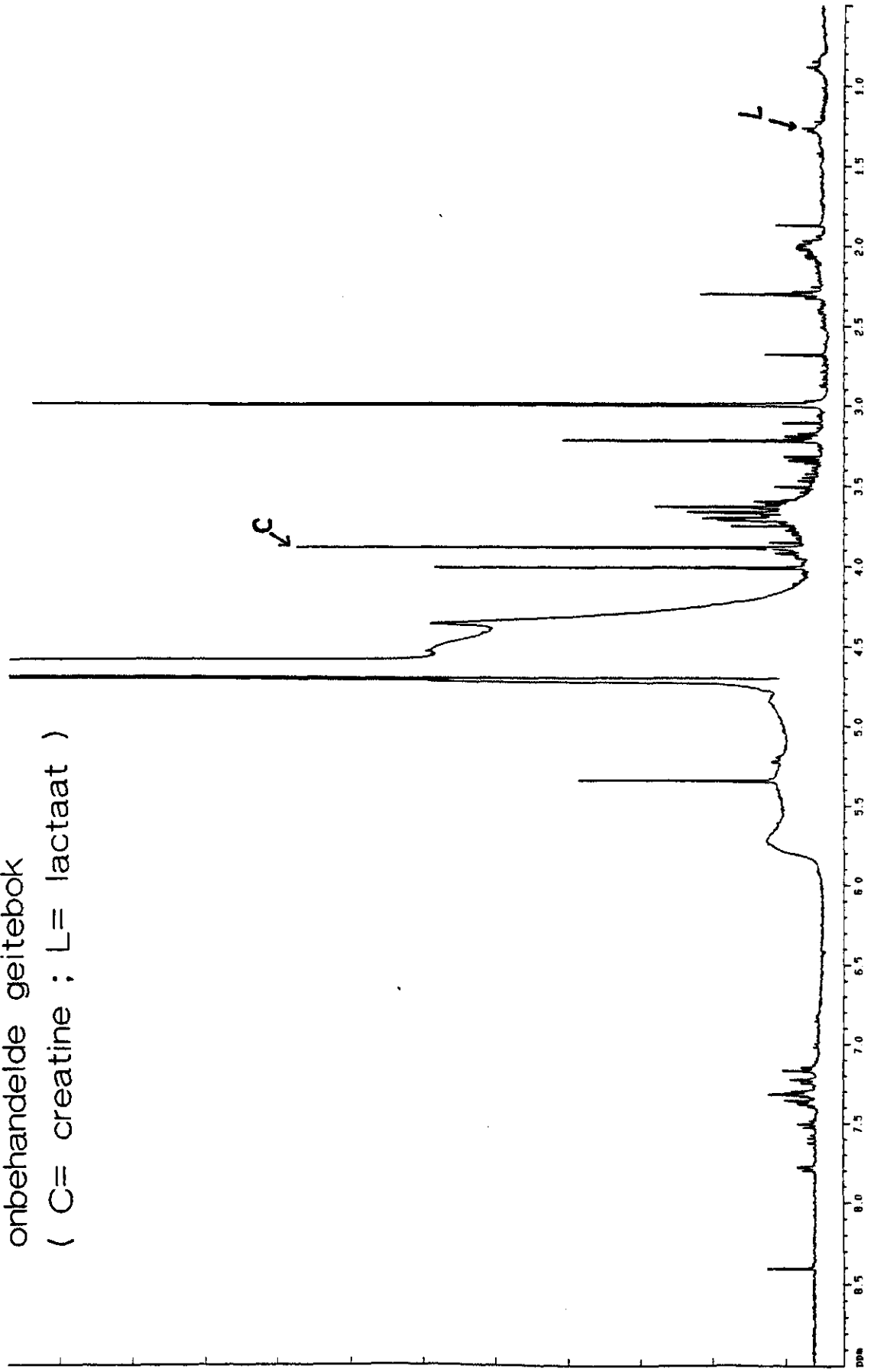
diernr.	behandeld met	proefdag-nummer	datum monstername 1991	gehalten in ng/ml					
				Cb		E2		T	
				urine	plasma	urine	plasma	urine	plasma
19	controle		26/3	<3	< 0.04	0.09	<0.02	7.7	1.9
19	controle		29/3	<3	< 0.04	0.07	<0.02	4.8	0.9
19	controle		1/4	<3	< 0.04	0.10	<0.02	7.9	0.6
19	controle		5/4	<3	< 0.04	0.09	<0.02	5.8	2.8
19	controle		11/4	<3	< 0.04	0.12	<0.02	7.4	0.6
19	controle		20/4	<3	< 0.04	0.07	<0.02	4.5	0.7
19	controle		24/4	<3	< 0.04	0.20	<0.02	4.1	<0.3
25	controle		3/4	<3	< 0.04	0.13	<0.02	14.7	0.6
25	controle		5/4	<3	< 0.04	0.09	<0.02	12.2	1.4
25	controle		8/4	<3	< 0.04	0.09	<0.02	11.8	1.0
25	controle		12/4	<3	< 0.04	0.08	<0.02	14.0	<0.3
25	controle		18/4	<3	< 0.04	0.17	<0.02	22.4	0.3
25	controle		27/4	<3	< 0.04	0.06	<0.02	7.1	<0.3
25	controle		1/5	<3	< 0.04	0.32	<0.02	6.7	<0.3
36	controle		17/4	<3	< 0.04	0.05	<0.02	4.4	0.3
36	controle		20/4	<3	< 0.04	0.06	<0.02	4.8	2.8
36	controle		22/4	<3	< 0.04	0.05	<0.02	4.3	0.9
36	controle		26/4	<3	< 0.04	0.05	<0.02	4.9	<0.3
36	controle		2/5	<3	< 0.04	0.06	<0.02	4.0	2.1
36	controle		11/5	<3	< 0.04	0.75	<0.02	11.0	3.5
36	controle		15/5	<3	< 0.04	0.08	<0.02	3.0	<0.3

BIJLAGE 5: Figuren horende bij hoofdstuk 5

Figuur 5.1
Verdeling L/C ratio (ppb/ppm)
na 4 weken behandeling



Figuur 5.2A
1D $^1\text{H-NMR}$ spectrum van een urine van een
onbehandelde geitebok
(C= creatine ; L= lactaat)

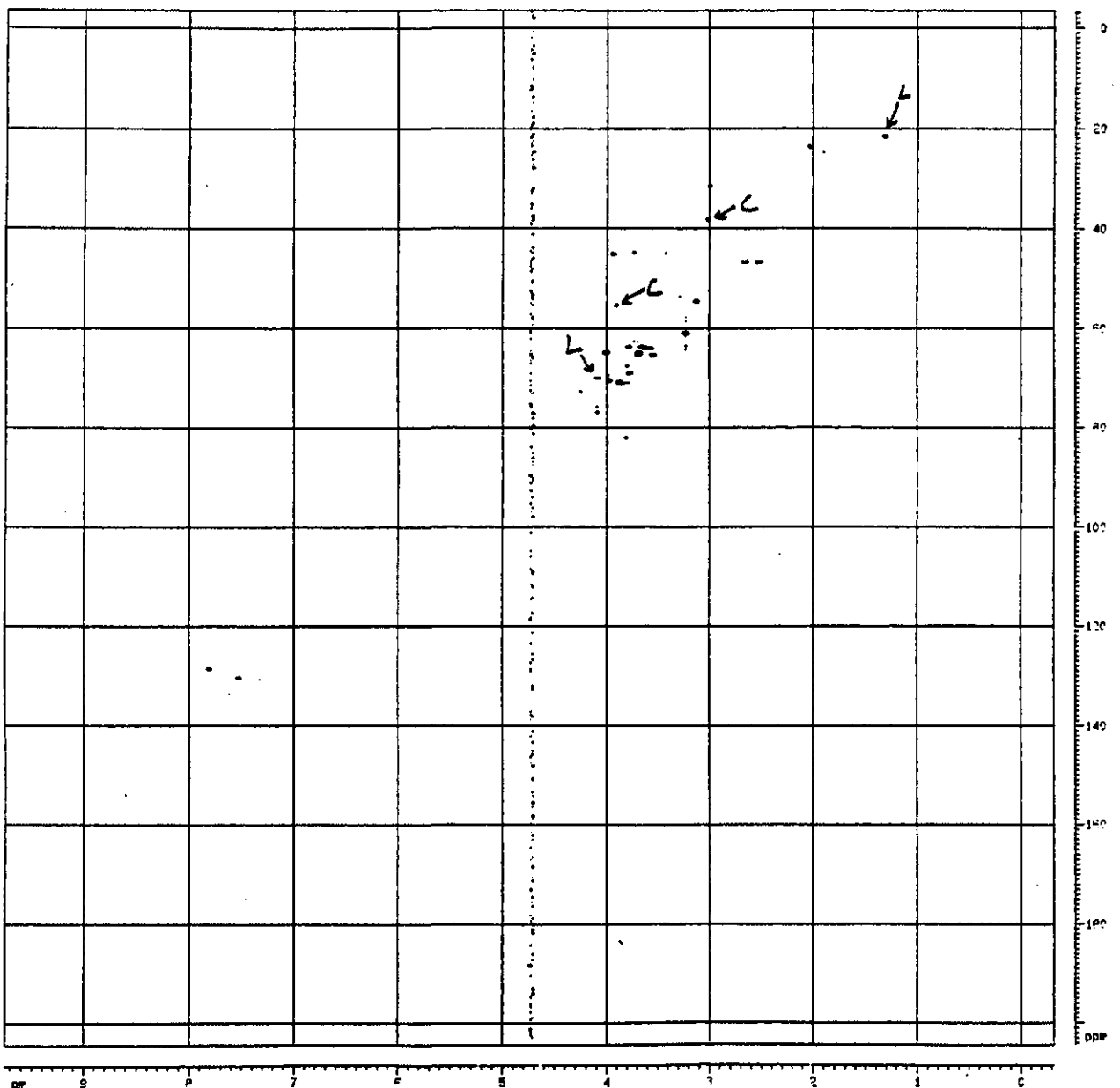


Figuur 5.3B

2D ^1H - ^{13}C single quantum coherence spectrum;
urine (clenbuterol)

Selectie van 1-bands correlaties

(C= creatine ; L= lactaat)

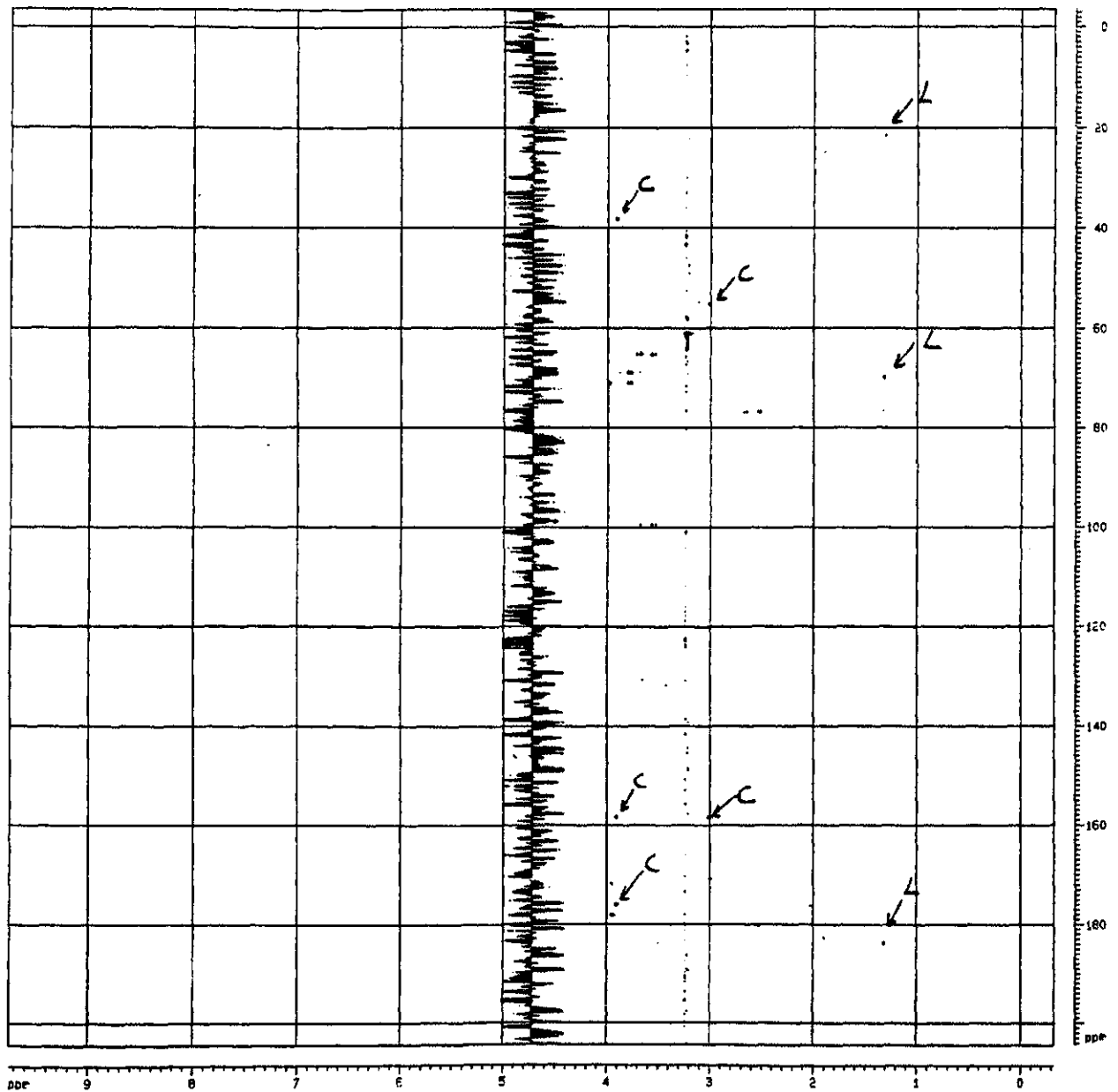


Figuur 5.3C

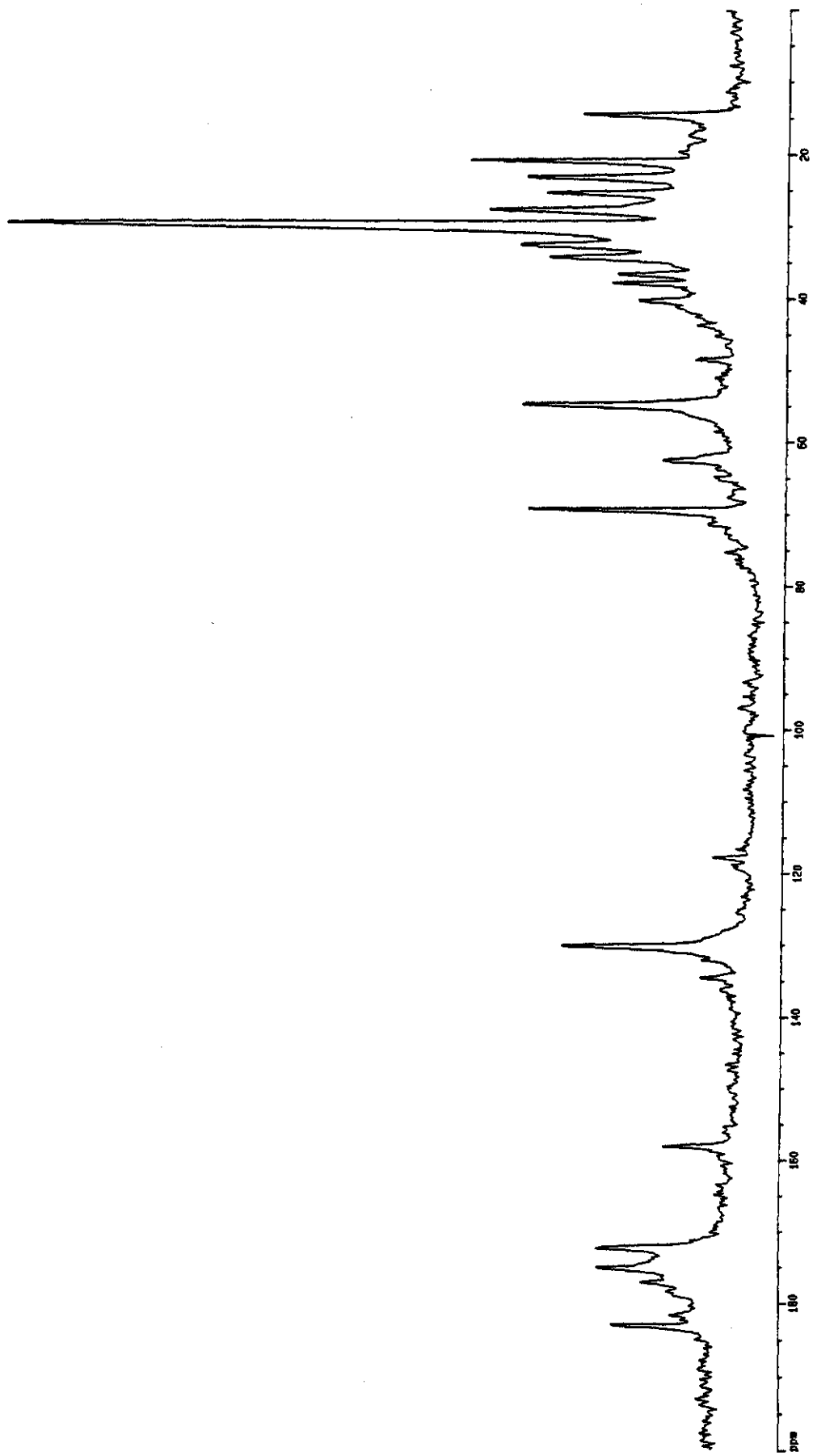
2D ^1H - ^{13}C single quantum coherence spectrum;
urine (clenbuterol)

Selectie van 2- en 3-bands correlaties

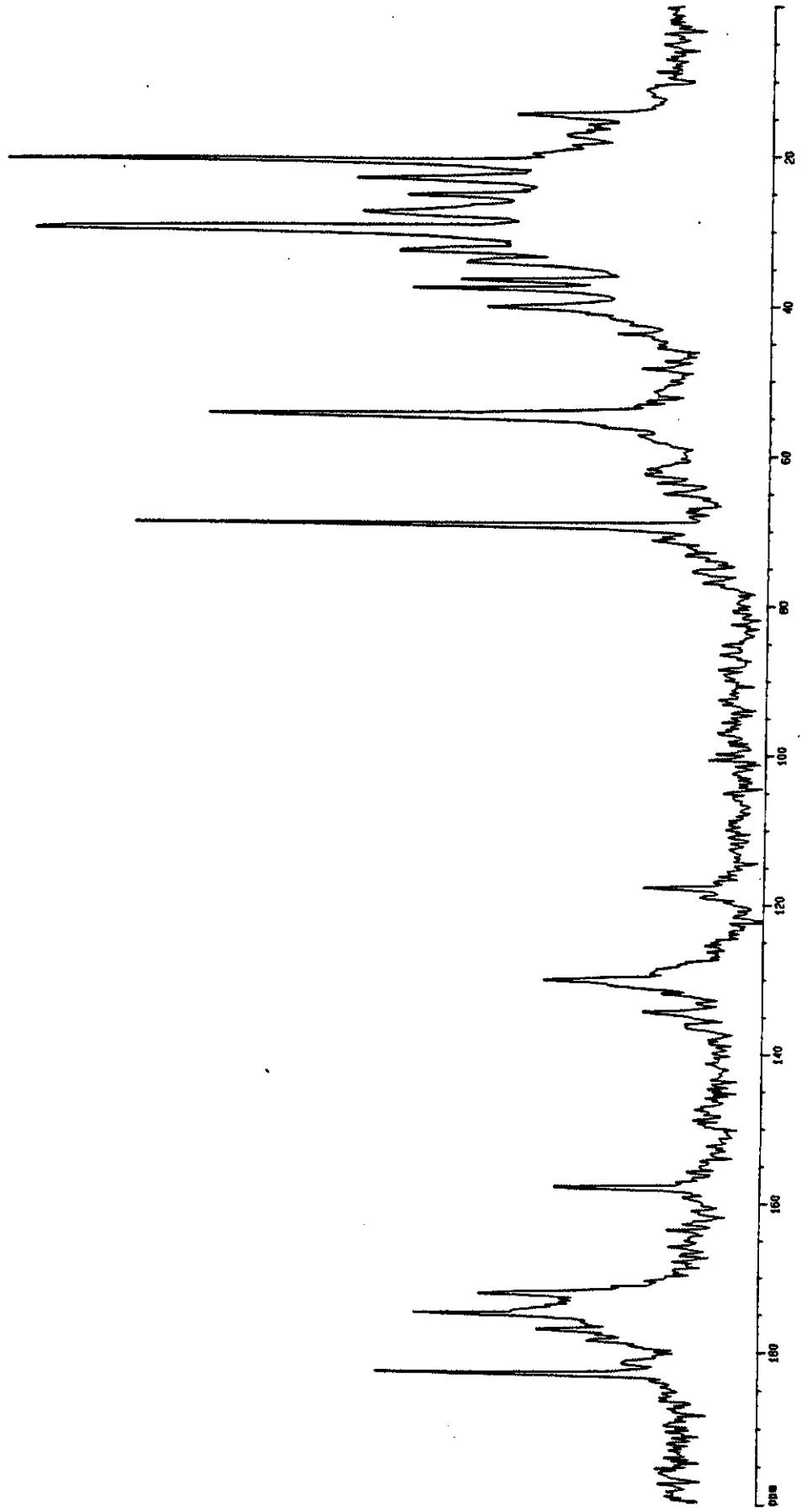
(C= creatine ; L= lactaat)



Figuur 5.4A
1D ^{13}C NMR spectrum van spierweefsel van een
onbehandelde geitebok

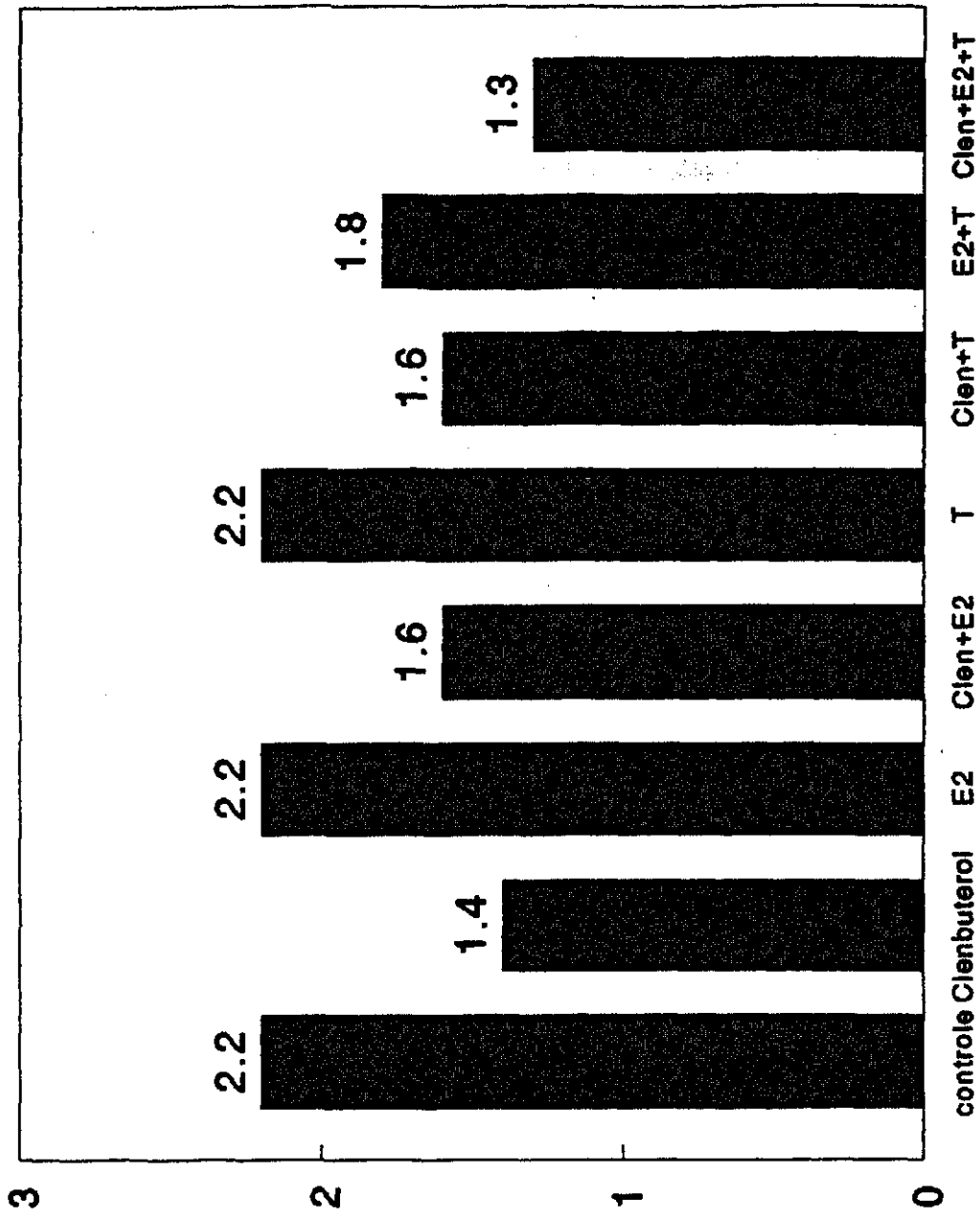


Figuur 5.4B
1D ^{13}C NMR spectrum van een spierweefsel van
een met clenbuterol behandelde geitebok



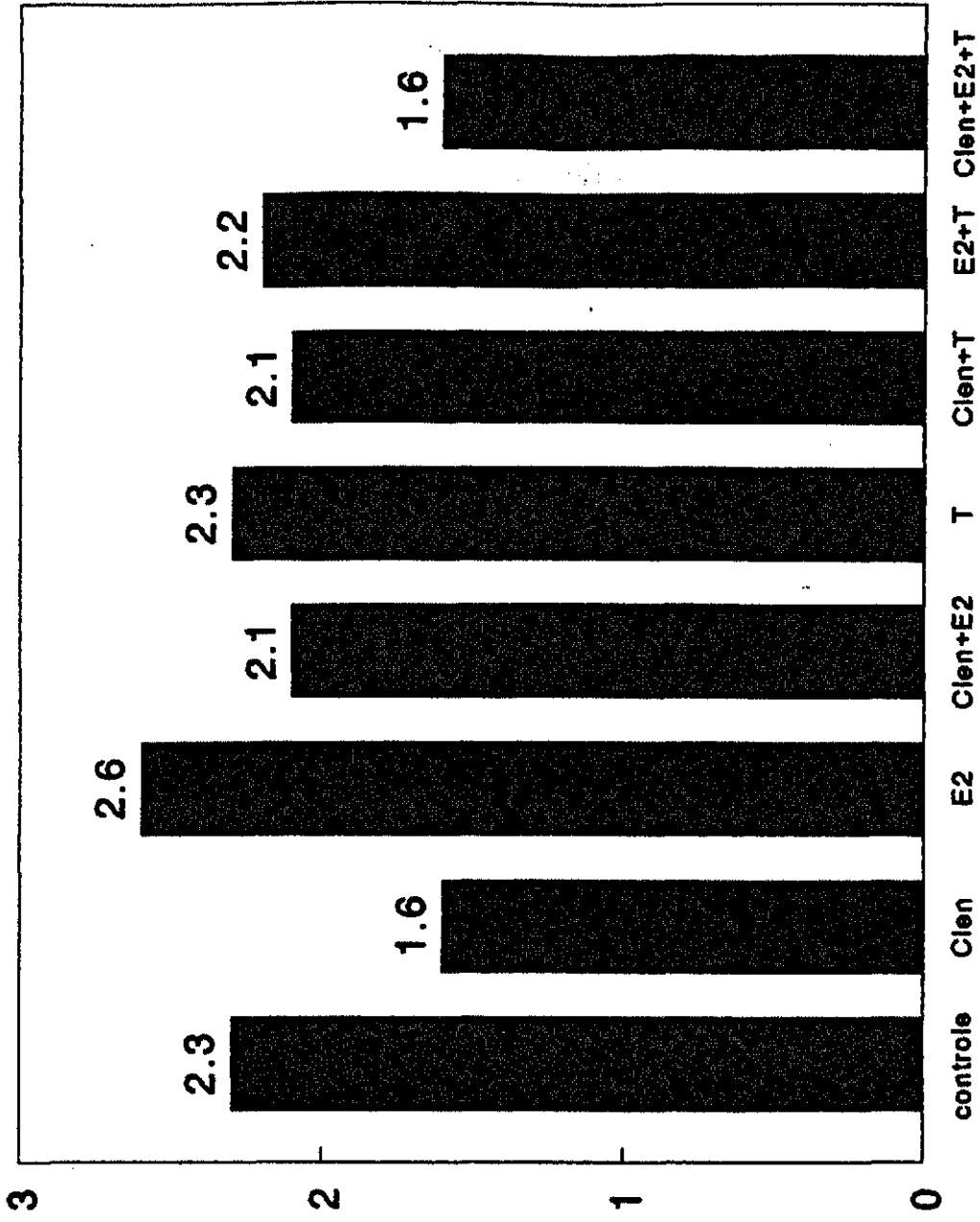
BIJLAGE 6: Figuren horende bij hoofdstuk 6

percentage vet in de longissimus dorsi spieren



Figuur 6.1

percentage vet in de biceps femoris spieren



Figuur 6.2