

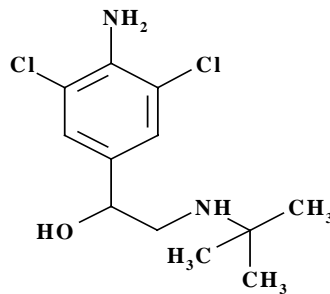
2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 *CLENBUTEROL*

Clenbuterol ist ein synthetischer Abkömmling des endogenen Catecholamins Adrenalin, einem Hormon des Nebennierenmarks, mit selektiver Wirkung auf die adrenergen β_2 -Rezeptoren (Engelhardt, 1976). Es wurde synthetisiert, indem am Aromaten zwei Chloratome sowie eine Aminogruppe eingeführt und die Methylgruppe am Stickstoffatom der Seitenkette durch eine tert. Butyl-Gruppe ersetzt wurde (Keck et al., 1972). Clenbuterol gehört entsprechend seiner erregenden Wirkung auf den sympathischen Anteil des vegetativen Nervensystems zur Gruppe der Sympathomimetika. Diese Gruppe wird aufgrund der genannten Wirkungen auch als β_2 - selektive Sympathomimetika oder als β_2 - adrenerge Rezeptoragonisten bezeichnet. Im weiteren Text werden sie auch als β_2 - adrenerge Agonisten, als β_2 - Agonisten oder in der übergeordneten Gruppe als β - Agonisten bezeichnet.

Clenbuterol (NAB 365):

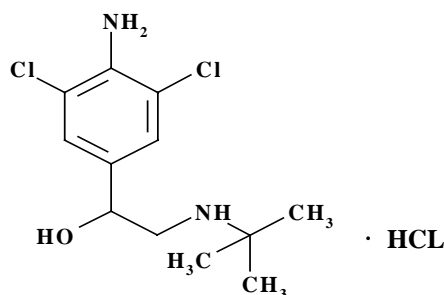
- Strukturformel:



- Chemischer Name (IUPAC): 4-Amino- α -[(tert-butylamino)methyl]-3,5-dichlorbenzylalkohol
- Summenformel: $C_{12}H_{18}Cl_2N_2O$
- Molekülmasse: 277,18

Clenbuterolhydrochlorid (NAB 365Cl):

- Strukturformel:



- pharmakologisch wirksamer Bestandteil von clenbuterolhaltigen Tierarzneimitteln, wie Ventipulmin[®] und Planipart[®]
- Chemischer Name (IUPAC): 4-Amino- α -[(tert-butylamino)methyl]-3,5-dichlorbenzylalkohol hydrochloride
- Summenformel: $C_{12}H_{19}Cl_3N_2O$
- Molekülmasse: 313,65
- Schmelzpunkt: 174 - 175,5° C (Merk Index)

2.2 *GESCHICHTLICHES*

Die Wirkungsweise von Sympathomimetika unter anderem auf die Bronchialmuskulatur wurde schon frühzeitig zur Therapie von Asthma bronchiale genutzt. Anfangs stand zur Therapie neben dem natürlichen Sympathomimetikum Adrenalin nur das von dessen Grundstruktur abgeleitete synthetisch hergestellte Isoprenalin zur Verfügung, welches von Konzett entwickelt wurde (Konzett, 1940). Isoprenalin zeigt neben seiner erwünschten bronchospasmolytischen Wirkung auch eine relativ starke stimulierende Wirkung auf die Herzmuskulatur. Außerdem besitzt es eine kurze biologische Halbwertszeit sowie eine unzureichende orale Verfügbarkeit. Ein entscheidender Schritt auf der Suche nach Substanzen, welche die genannten Nachteile nicht besitzen, waren die Erkenntnisse des Vorhandenseins verschiedener Rezeptoren (Dale, 1906) sowie die Unterscheidung in α - und β -Rezeptoren (Ahlquist, 1948) und deren Einteilung in α_1 - und α_2 -Rezeptoren (Langer, 1974; Berthelsen & Pettinger, 1977) und β_1 - und β_2 -Rezeptoren (Lands et al., 1967). Jetzt konnte nach Substanzen mit selektiver Wirkung auf die β_2 -Rezeptoren gesucht werden. Diese synthetisch hergestellten Substanzen sollten ihre krampflösende Wirkung auf die Bronchialmuskulatur bei so geringen Dosierungen erreichen, dass die Herzfunktion und damit der gesamte Kreislauf möglichst unbeeinflusst bleiben. Engelhardt (1976) hat die bekanntesten Vertreter und deren Vor- und Nachteile gegenüber anderen β -Agonisten in chronologischer Reihenfolge ihrer Entdeckung zusammengefasst. Diese sind im Folgenden tabellarisch zusammengestellt (Tabelle 1).

Tabelle 1 **Pharmakologische Wirkungen einzelner β -Agonisten**
(zusammengestellt nach Engelhardt, 1976)

β -Agonist	erste Berichte [Jahr]	Wirkungsweise
Isoetharin	1950	<ul style="list-style-type: none"> • stärkere mimetische Wirkung auf β_2-Rezeptoren als auf β_1-Rezeptoren
Meta-proterenol	1961	<ul style="list-style-type: none"> • bessere orale Verfügbarkeit und längere Wirkungsdauer als Isoprenalin
Quinterenol	1967	<ul style="list-style-type: none"> • längere Wirkungsdauer als Isoprenalin nach oraler, subkutaner, intravenöser und inhalativer Zufuhr; • β_1-Rezeptor-Aktivitäten konnten durch β-Blocker gehemmt werden
Soterenol	1968	<ul style="list-style-type: none"> • selektive Wirkung auf β_2-Rezeptoren; • Stimulierung der β_1-Rezeptoren zeigt sich noch in der Steigerung der Herzfrequenz aber die Kontraktilität des Herzmuskels bleibt unbeeinflusst; • schwache α-mimetische Effekte
Salbutamol	1968	<ul style="list-style-type: none"> • gegenüber Isoprenalin: bevorzugte Wirkung auf β_2-Rezeptoren; • längere Wirkungsdauer nach oraler, parenteraler, und inhalativer Zufuhr
Terbutalin	1969	<ul style="list-style-type: none"> • tert Butyl-Analog des Metaproterenols mit besserer selektiver auf die β_2-Rezeptoren und besserer parenteraler Wirkung als Metaproterenol und ähnlicher oraler und subkutaner Wirkung wie dieses; • ähnlich spezifisch wie Salbutamol
Rimiterol	1971	<ul style="list-style-type: none"> • in fünffach höherer Dosis vergleichbare bzw. länger anhaltende Wirkung als bei Isoprenalin bei geringeren Nebenwirkungen auf die Herzfunktion; • geringere orale Wirksamkeit als Metaproterenol und beim Menschen bis 10 mg sogar wirkungslos
Fenoterol	1972	<ul style="list-style-type: none"> • bessere selektive Wirkung auf die β_2-Rezeptoren nach intravenöser und inhalativer Zufuhr als Metaproterenol; • orale Verfügbarkeit beim Menschen von ca. 60 %; • bei inhalativer Anwendung therapeutischer Dosen keine Nebenwirkungen auf die Herzfunktion
Clenbuterol	1972	<ul style="list-style-type: none"> • gegenüber allen genannten β-Agonisten: ausgeprägtere selektive Wirksamkeit auf β_2-Rezeptoren bei geringerer Restwirkung auf β_1-Rezeptoren, so dass die Nebenwirkungen auf die Herzfunktion am geringsten sind; • lang anhaltende orale Wirkung und bessere orale Verfügbarkeit
Carbuterol	1974	<ul style="list-style-type: none"> • ähnliche pharmakologische Wirkung wie Salbutamol

Inzwischen wurden mehr als 50 β_2 -Agonisten beschrieben und immer neue zum Beispiel in „Schwarzmarkt“-Zubereitungen identifiziert (Poletini, 1996). So konnten Leysens et al. (1993) und Santamatilde et al. (1994) in Futterergänzungspräparaten vom „Schwarzmarkt“ neue Clenbuterolanaloga wie Clenpenterol, Clenproperol, Clenisopenterol, Isopropylclenbuterol, Clencyclohexerol und Methylclenbuterol identifizieren. Weitere in der vorliegenden Arbeit angesprochene β -Agonisten sind Cimaterol, Ractopamin, Isoproterenol, 6-amino- α -{[(1-methyl-3-phenylpropyl) amino]methyl}-3-pyridin methanol dichlorid (L-644,969) und Orciprenalin.

2.3 WIRKUNGSMECHANISMUS VON β -AGONISTEN

2.3.1 Signalaufnahme und -übertragung

Die wichtigsten Bestandteile der Zellmembran für die Wirkung von β -Agonisten sind die spezifischen Rezeptoren (sogenannte integrale Membranproteine), das heterotrimere G-Protein mit seinen α -, β - und γ -Untereinheiten und die Adenylatcyclase. G-Proteine können entsprechend ihrer Funktion in G_s (stimulierend), G_i (hemmend), G_t (Transduktion) und G_o (andere Wirkungen) eingeteilt werden (Karlson et al., 1994). Die Rezeptoren besitzen an der Außenseite der Membran Bindungsstellen, an die verschiedene Signalmoleküle wie Hormone oder Neurotransmitter anknüpfen können. Vor deren Bindung sind die genannten Zellmembranbestandteile inaktiv.

Abbildung 1 stellt den Wirkungsmechanismus von körpereigenen Hormonen und von synthetisch hergestellten β -Agonisten in der Zelle dar.

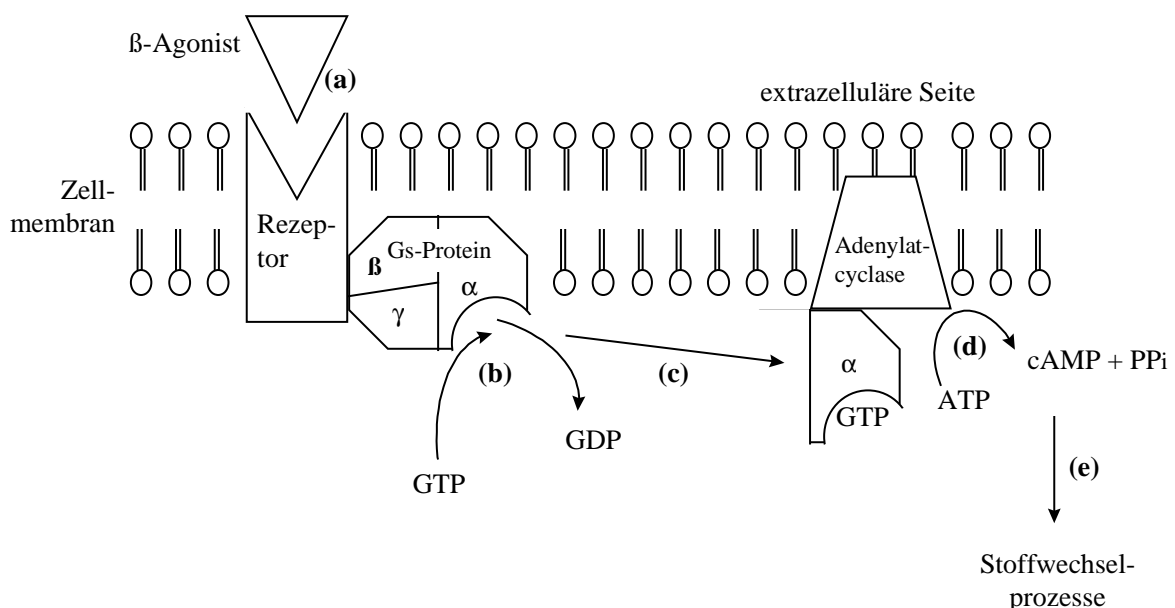


Abbildung 1 Wirkungsmechanismus von β -Agonisten in der Zelle

Der in der Abbildung 1 dargestellte Wirkungsmechanismus soll im Folgenden kurz erläutert werden: Durch Kopplung des β -Agonisten an den Rezeptor erfolgt der Aktivierungsprozess **(a)**. Die Aktivierung des Rezeptors wird durch Konformationsänderung auf das an der Innenseite der Membran lokalisierte inaktive G_s -Protein (stimulierendes Guanin-Nukleotid regulatorisches Protein) übertragen und bewirkt einen Austausch von GDP gegen GTP (Pfeuffer, 1980; Strosberg, 1993) **(b)**. Die so aktivierte α -Untereinheit des G-Proteins dissoziiert von der β - und γ - Untereinheit ab und lagert sich mit dem GTP gekoppelt an die Adenylatcyclase an, wodurch diese wiederum aktiviert wird (Stiles et al., 1984) **(c)**. Die Adenylatcyclase katalysiert die Umwandlung von ATP zu cAMP unter Abspaltung von Diphosphat **(d)**. Dabei kommt es zur Zunahme des intracellulären cAMP- Gehaltes von 10^{-7} mol/l und weniger auf 10^{-6} mol/l und mehr (Schultz et al., 1980). Das cAMP aktiviert nun als zellulärer Botenstoff oder „Second messenger“ die inaktiven Effektorenzyme (Proteinkinasen und Phosphatasen), wodurch der eigentliche biologische Effekt ausgelöst wird (Huttunen et al., 1970) **(e)**. Die Wirkungsdauer ist kurz, da cAMP durch Hydrolyse mittels einer Phosphodiesterase in Sekunden bis Minuten zu 5'-AMP abgebaut wird (Schultz et al., 1980).

2.3.2 Regulation der Signalübertragung

Verschiedenste Mechanismen regulieren das durch Hormone-Rezeptor Kopplung aktivierbare Adenylatcyclase-System. Da die Regulation der Signalübertragung noch nicht vollständig geklärt ist, sollen hier nur kurz die wichtigsten Grundprinzipien dargestellt werden. Bisher wurden hauptsächlich zwei Mechanismen beschrieben, die homologe und die heterologe Regulation (Lefkowitz et al., 1983; Stiles et. al., 1984), wobei es zur Desensibilisierung oder zur Amplifikation der Rezeptoren kommen kann. Eine Empfindlichkeitsabnahme (Desensibilisierung) wird zum Beispiel ausgelöst, wenn Rezeptoren einem hormonalen Stimulus über einen längeren Zeitraum ausgesetzt sind oder wenn dessen Konzentration sehr hoch ist. Die Desensibilisierung führt zu einer Verminderung der Anzahl der Rezeptoren („down regulation“), die häufig mit einer Abschwächung der Affinität zum Rezeptor verbunden ist („un-coupling“) (Salobir, 1990). Buur et al. (1982) wiesen eine Desensibilisierung der β_2 -adrenergen Rezeptoren im Muskel von Schweinen durch hohe Terbutalindosen (100 mg/kg) nach. Bei Ratten, die über 18 Tage mit Clenbuterol behandelt wurden, sank die β -Rezeptorempfindlichkeit um 50 %, wobei das Verhältnis zwischen β_1 - und β_2 - Rezeptoren unbeeinflusst blieb (Rothwell et al., 1987).

Eine längere Blockierung der β -adrenergen Rezeptoren durch Antagonisten oder die verminderte Empfindlichkeit durch physiologische Vorgänge wie die Gravidität (Litime et al., 1989) ziehen dagegen eine Verstärkung (Amplifikation) der Signalübertragung nach sich.

Diese kann ebenfalls durch Änderung der Anzahl oder der Affinität von Rezeptoren erreicht werden (Sibley & Lefkowitz, 1985 und 1987).

Homologe Regulation

Bei der homologen Regulation kommt es nach Aktivierung des Rezeptors durch eine spezifische β -adrenerge Rezeptorkinase aus dem Zellplasma zu einer Phosphorylierung am Rezeptor. Das G_s -Protein wird entkoppelt und der Rezeptor aus der Zellmembran herausgelöst. Im Zellplasma wird der Rezeptor dann entweder durch eine Phosphatase dephosphoryliert und ist nach Rückkehr an die Zelloberfläche wieder aktivierbar oder er wird lysosomal abgebaut (Stiles et. al., 1984; Sibley et al., 1986). Damit ist diese Art der Steuerung nicht cAMP vermittelt (Sibley & Lefkowitz, 1985). Bracci et al. (1996) testeten die Änderung der Rezeptorzahl über die „down regulation“ durch eine Dauerbehandlung von Ratten mit Clenbuterol über 7 Tage. Diese führte zu einer signifikanten Verringerung der Anzahl von β_2 -Rezeptoren in Lymphozyten um 58 % und im Muskel um 45 %. Die Affinität der Rezeptoren blieb unbeeinflusst. Während nach 5 bzw. 7 Tagen Wartezeit im Muskel wieder die Rezeptoranzahl der Kontrollen erreicht wurde, blieb die Anzahl in den Lymphozyten verringert.

Roets & Burvenich, 1993 konnten die „down regulation“ der Rezeptoranzahl in der glatten Muskulatur und im Tracheaepithel nach Langzeitbehandlung von Kälbern mit Clenbuterol nachweisen. Trotzdem konnte keine Desensibilisierung der Trachea beobachtet werden, da die cAMP Produktion fast unbeeinflusst blieb. Dies könnte eine Erklärung für die Wirksamkeit der β -Agonisten auch bei Langzeitbehandlung sein.

Heterologe Regulation

Bei der heterologen Regulation wird der Rezeptor nicht aus der Zellwand herausgelöst, sondern es wird eine Kopplung des G_s -Proteins an den Rezeptor verhindert oder das G_s -Protein wird entkoppelt. Auch eine Phosphorylierung des Rezeptors und des G_s -Proteins kann die Kopplung verhindern. Die Steuerung mittels heterologer Regulation erfolgt somit über den cAMP-Gehalt (Sibley & Lefkowitz, 1985). Eine Aktivitätssteigerung des G_s -Proteins kann durch Phosphorylierung der katalytischen Untereinheit der Adenylatcyclase hervorgerufen werden (Stiles et. al., 1984; Sibley & Lefkowitz, 1985 und 1987). Alle Einflüsse, die nicht in direkter Interaktion mit dem adrenergen Rezeptoren stehen, aber den Mechanismus der Adenylatcyclase-Aktivierung beeinflussen, können Auslöser der heterologen Regulation sein. Genannt werden Catecholamine oder andere Hormone wie Glucokortikosteroide. Glucokortikoide erhöhen die Anzahl der Rezeptoren im Herzen (Abrass & Scarpace, 1981) und regulieren die Anzahl und die Sensitivität von β -Rezeptoren in Muskelzellen in vitro, was sich in einer Verringerung der durch β_2 -Agonisten stimulierten Adenylatcyclase- und cAMP-Akkumulation in den Zellen zeigt (Smith et al., 1981).

2.3.3 Typen von adrenergen Rezeptoren

Die Wirkung von Catecholaminen wie Adrenalin und Noradrenalin wird bestimmt durch den Typ des membranständigen Rezeptors. Derzeit sind vier Subtypen eindeutig definiert, nämlich die α_1 - und α_2 - sowie β_1 - und β_2 - adrenergen Rezeptoren. Arch (1984) beschrieb einen weiteren atypischen Rezeptor im braunen Fettgewebe, der von Emorine et al. (1989) als β_3 -Rezeptor definiert wurde. Außerdem scheint es auch im Skelettmuskel und im Herz atypische Wirkungsmechanismen zu geben, bei denen noch nicht geklärt ist, ob es sich um einen vierten adrenergen Rezeptor oder ebenfalls um den β_3 - Rezeptor handelt (Strosberg & Pietri-Rouxel, 1996). Je nach Kopplung ein und desselben Hormons an einen α - oder β -Rezeptor werden entgegengesetzte Prozesse ausgelöst. Rezeptoren besitzen eine unterschiedliche Affinität zu den einzelnen Catecholaminen.

2.3.3.1 α -Rezeptoren

Die Stimulierung von α_1 - adrenergen Rezeptoren in der Zellmembran führt über die Aktivierung der Phospholipase C zu einem durch Verschiebung von Inositol-1,4,5-triphosphat vermittelten Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels und des cGMP-Gehaltes (Schultz et al., 1980; Fain, 1982). Durch Aktivierung der α_2 -Rezeptoren kommt es zur Hemmung der Adenylatcyclase und zum Abfall des intrazellulären cAMP-Spiegels (Fain, 1982; Fain & García-Sáinz, 1983). Wenn auch auf unterschiedlichem Weg, so führen beide Prozesse zur Kontraktion der glatten Muskulatur (Fain & García-Sáinz, 1983; Karlson et al., 1994). In Rattenadipozyten werden nach Stimulierung der α_1 -Rezeptoren u.a. eine Aktivierung der Glykogen-Phosphorylase und eine Inaktivierung der Glykogen-Synthetase ausgelöst. In Hamsteradipocyten löst die Stimulierung der α_2 -Rezeptoren eine Hemmung der hormonellen Aktivierung der Lipolyse aus (Fain & García-Sáinz, 1983). In verschiedenen Teilen des Gehirns konnten α -Rezeptoren ebenfalls lokalisiert werden (Palacios et al., 1987). Während α_1 -Rezeptoren eine höhere Affinität zu Noradrenalin als zu Adrenalin besitzen, ist es bei den α_2 -Rezeptoren umgekehrt (Lefkowitz et al., 1983; Fain & García-Sáinz, 1983).

2.3.3.2 β -Rezeptoren

Wie unter 2.3.1 bereits beschrieben, führt die Aktivierung der β -adrenergen Rezeptoren über die Kopplung an die α -Untereinheit des G_s -Proteins zur Stimulierung der Adenylatcyclase (Stiles et al., 1984, Strosberg & Pietri-Rouxel, 1996). Bisher wurde davon ausgegangen, dass dieser Prozess auf die β_1 -, β_2 - und β_3 - Rezeptoren zutrifft. Strosberg & Pietri-Rouxel (1996) ziehen aus Untersuchungen von Chaudry et al. (1994) den Schluss, dass eventuell auch Teile der anderen Untereinheiten des G_s -Proteins (β und γ) oder das G_i -Protein an der Kopplung

beteiligt sein könnten. Chaudry et al. (1994) hatten verschiedene Wechselwirkungen von β_1 - und β_3 - Rezeptoren mit dem G_1 -Protein an Rattenadipozyten getestet und Wechselwirkungen mit β_3 - Rezeptoren festgestellt.

Die Affinität der einzelnen Subtypen zu den einzelnen Catecholaminen ist unterschiedlich hoch. So haben β_1 - Rezeptoren die gleiche Affinität zu Noradrenalin und Adrenalin, β_2 - Rezeptoren eine höhere Affinität zu Adrenalin und β_3 - Rezeptoren eine höhere Affinität zu Noradrenalin (Arch et al., 1984; Stiles et al., 1984, Strosberg & Pietri-Rouxel, 1996). Die Affinität des atypischen β_3 - Rezeptors für natürliche Agonisten ist allerdings bedeutend geringer, so dass wahrscheinlich bedeutend größere Mengen von zirkulierenden Catecholaminen notwendig sind, um den β_3 - Rezeptor zu aktivieren (Strosberg & Pietri-Rouxel, 1996).

β -Rezeptoren sind in den unterschiedlichsten Organen und Geweben lokalisiert. Stoffel (1993) konnte beim Rind die Expression des β_2 -Rezeptors in Muskulatur, Fett, Herz, Lunge, Uterus, Niere, Leber, Mamma und Pansen nachweisen. Dagegen fand er β_3 -Rezeptoren nur im Fettgewebe. Die Verteilung von β_1 - und β_2 - adrenergen Rezeptoren in verschiedenen Organen und Zellen ist in Tabelle 2 dargestellt. Tabelle 3 gibt die wichtigsten über β_1 -, β_2 - oder β_3 -adrenergen Rezeptoren vermittelten Wirkungen in den verschiedenen Organen und Geweben wieder.

Tabelle 2 Verteilung der β_1 - und β_2 -adrenergen Rezeptoren entsprechend ihrem Vorkommen in verschiedenen Organen und Zellen (Lefkowitz et al., 1983; Stiles et al., 1984; Rothwell et al., 1987)

Organen/Zellen	Spezies	Verhältnis [%]	
		β_1 -Rezeptoren	β_2 -Rezeptoren
Herz	Ratte	83-100	0-17
	Hund	85-100	0-15
	Frosch	15	85
	Kaninchen	72-93	7-28
	Schwein	77-100	0-23
	Katze	78-98	2-22
	Mensch	74-86	14-26
	Skelettmuskel	Ratte	15
Lunge	Ratte	15-25	75-85
	Kaninchen	60-80	20-40
	Rind	25	75
	Hund	5	95
	Schwein	20	80
	Hamster	4	96
	Plazenta	Mensch	75
Uterus (Estrogen dominiert)	Ratte	20	80
	(Progesteron dominiert) Ratte	0	100
Kleinhirn	Ratte	0	100
Großhirn	Ratte	55-65	35-45
	Frosch	0	100
Milz	Ratte	35	65
Erythrozyten	Ratte	0	100
	Vögel	100	0
Adipozyten	Maus	2	98

Tabelle 3 Wirkungen von β -adrenergen Agonisten über die hauptsächlich in jeweiligen Organ oder Gewebe vorkommenden Rezeptoren

Organe/Gewebe	β_1 -Rezeptoren	β_2 -Rezeptoren	β_3 -Rezeptoren	Autor
Herz	Gefäßverengung, Herzfrequenz \uparrow , Tachykadie, Kontraktilität \uparrow			Strosberg & Pietri-Rouxel, 1996; Ungemach, 1997
Lunge		Relaxation		Stoffel, 1993
Niere	Renin- freisetzung			Timmermann, 1987
Uterus		Relaxation		Engelhardt, 1976
Gastrointestinal- Trakt		Relaxation, Motilität und Tonus \downarrow		Engelhardt, 1976; Kopitar & Zimmer, 1976b; Timmermann, 1987
Leber		Glycolyse \uparrow Gluconeogenese \uparrow		Upton, 1988
glatte Muskulatur		Relaxation		Engelhardt, 1976;
Skelettmuskulatur		Glycolyse \uparrow Änderung der Kontraktilität		Upton, 1988; Salobir, 1990
Weißes Fettgewebe	Lipolyse \uparrow	Lipolyse \uparrow Lipogenese \downarrow		Jakobsson et al., 1981; Stiles et al., 1984; Fain & García-Sáinz, 1983
Braunes Fettgewebe			Lipolyse \uparrow Thermogenese \uparrow	Arch et al., 1984; Fiems, 1987

2.3.4 Biologische Wirkung von β -Agonisten

Durch die über körpereigene Catecholamine, β -Agonisten und andere Stoffe ausgelöste Aktivierung des cAMPs (s. unter 2.3.1) werden Effektorenzyme (Proteinkinasen und Phosphatasen) aktiviert, die verschiedene Stoffwechselprozesse in Gang setzen. Proteinkinasen sind für die Phosphorylierung von Proteinen verantwortlich. Es gibt mindestens 14 verschiedene solcher Proteine (Rinke, 1990). Die wichtigsten direkten und indirekten Wirkungen auf Effektorzellen und die sich daraus für einzelne Gewebe und Systeme ergebenden Stoffwechseleffekte sollen im Folgenden näher erläutert werden:

Fettstoffwechsel

Bei wachsenden und ausgewachsenen Tieren ist die Menge der ins Fettgewebe eingelagerten Lipide vom Verhältnis zwischen Lipogenese und Lipolyse abhängig (Buttery & Dawson, 1987). Catecholamine steigern die Adenylatcyclase-Aktivität in den Adipozyten, wodurch über eine Erhöhung der cAMP-Konzentration die Proteinkinase aktiviert wird (Fain, 1982). Diese wiederum aktiviert über eine Proteinphosphorylierung die hormonsensitive Triacylglycerol-Lipase (Huttunen et al., 1970; Fain & García-Sáinz, 1983). Die Lipase spaltet Triacylglycerole (Triglyceride) durch enzymatische Hydrolyse in Diacylglycerol, welche durch weitere Lipasen zu Glycerol (Glycerin) und freien Fettsäuren abgebaut und ins Blut abgegeben werden (Karlson et al., 1994). Catecholamine steigern somit die lipolytische Aktivität und mobilisieren die Fettreserven im Gewebe (Huttunen et al., 1970). Peterla & Scanes (1990) beobachteten eine erhöhte Freisetzung von Glycerol und freien Fettsäuren nach Behandlung mit verschiedenen β_2 -Agonisten in vitro. Thornton et al. (1985); Rule et al. (1987) und Orcutt et al. (1989) konnten die durch Clenbuterol- bzw. Cimaterolgabe gesteigerte Lipolyse in Adipozyten anhand der erhöhten Glycerolfreisetzung in vivo und in vitro nachweisen. Mersmann (1987) wies eine erhöhte Anzahl freier Fettsäuren im Plasma bei Schweinen und eine gesteigerte Lipolyse im Fettgewebe von Schweinen durch die Gabe verschiedener Noradrenalin-Analoga einschließlich Isoproterenol aber nicht durch Clenbuterol nach.

Die Erhöhung der unveresterten Fettsäuren im Blut führt zur Hemmung der Lipogenese (Harper et al., 1987). Diese wurde von Thornton et al. (1985) nach Clenbuterolgabe in isolierten Adipozyten anhand der verringerten Acetataufnahme nachgewiesen. Eine verringerte Lipogeneserate und Fettsäuresynthese konnten auch Miller et al. (1989) bei Rindern nach oraler Gabe von Clenbuterol und Merkel et al. (1987) bei Schweinen nach Behandlung mit Ractopamin feststellen.

Insulin fördert im Fettgewebe Fettsäure- und Triacylglycerolbiosynthese, wahrscheinlich indem es zu einer Aktivitätszunahme der Acetyl-CoA-Carboxylase kommt. Letztere ist für die Carboxylierung von Acetyl-CoA zu Malonyl-CoA verantwortlich, das zur Kettenverlängerung beim Fettsäure-Aufbau benötigt wird. Außerdem fördert Insulin den Glucosetransport und die Vergrößerung der Zellen (Etherton, 1982). In vitro war die Lipogenese in Abwesenheit von Insulin zu 78 % gehemmt (Mills & Liu, 1990). Auch von einer Hemmung des Glucosetransports wurde nach Behandlung mit verschiedenen β_2 -Agonisten in vitro berichtet (Peterla & Scanes, 1990). Nach Clenbuterolgabe wurde eine Hemmung der durch Insulin stimulierten Lipogenese festgestellt. Dies drückte sich in einer dosisabhängigen Verminderung der Sensitivität des Gewebes gegenüber Insulin aus, welche durch eine Clenbuterol-induzierte Verminderung der Insulin-Rezeptor-Bindung und/oder Affinität

ausgelöst wurde. Außerdem kam es wahrscheinlich durch Hemmung der Acetyl-CoA-Carboxylase zu einer Verminderung der maximalen lipogenen Kapazität (Orcutt et al., 1989; Kim, 1983). Ractopamin und Clenbuterol hemmten die Insulinbindung in Fettzellen in vitro (Liu & Mills, 1990). Rule et al. (1987) wiesen eine Hemmung der Einlagerung von Diacylglycerolphosphat (zum Aufbau von Fettdepots) in Lipide durch Isoproterenol beim Schwein nach.

Smith et al. (1987a) fanden im subkutanen Fettgewebe von Färsen, die 50 Tage lang mit Clenbuterol oral behandelt wurden, einen um 60-80 % verminderten Acetateinbau in Fettsäuren sowie eine verminderte lipogene Enzymaktivität und Fettsäure-Proteinbindungsaktivität, wodurch im Ergebnis die Fettzellen um 20 % schmaler wurden. In vitro konnten Hu et al. (1987) ebenfalls eine verminderte Lipogeneserate im Fettgewebe von Schafen nach Cimaterolgabe nachweisen. Coleman et al. (1988) und Hu et al. (1987) beobachteten dagegen bei Schafen, denen Clenbuterol bzw. Cimaterol oral verabreicht wurde, eine erhöhte Acetataufnahme in die Lipide sowie eine erhöhte lipogene Enzymaktivität und Fettsäure-Proteinbindungsaktivität. Der auch bei Schafen festgestellte verminderte Fettsäureeinbau scheint daher nicht über den Mechanismus einer Reduzierung der Lipogenese erreicht zu werden.

Kohlenhydratstoffwechsel

Die Biosynthese von Glycogen kommt in fast allen Geweben vor, spielt aber vor allem in Leber und Muskel eine Rolle. Das durch Lipolyse im Fettgewebe entstandene Glycerol, aber auch das in der Muskulatur entstandene Laktat wird in der Leber durch die Glycerolkinase mit ATP phosphoryliert und kann zum Aufbau von Glucose verwendet werden (Gluconeogenese). Zinterol konnte zum Beispiel die Laktatfreisetzung aus Muskelzellen in vitro stimulieren (McElligott et al., 1989a). Glucose dient der durch Insulin stimulierten Synthese von Glycogen in der Leber (Glycogenese) und wird durch eine Phosphorylase wieder aus der Leber, die als Glycogenspeicher fungiert, mobilisiert (Glycolyse).

Die Phosphorylase wird wie folgt aktiviert:

In der Leber wird die Adenylatcyclase-Aktivität durch Adrenalin und Glucagon und im Muskelgewebe durch Adrenalin gesteigert (Cunningham et al., 1963), wodurch über eine Erhöhung der cAMP-Konzentration die Proteinkinase A aktiviert wird. Die Adenylatcyclase-Aktivität kann über diesen Weg auch durch β -Agonisten gesteigert werden. Die Proteinkinase A löst wiederum zwei Vorgänge aus (Karlson, 1994):

- a) Aktivierung der Phosphorylase-Kinase die ihrerseits mit ATP die inaktivierte Phosphorylase b in die aktive Phosphorylase a überführt,

- b) Phosphorylierung der I-Form der Glycogen-Synthase (Enzym der Glycogen-Biosynthese), wodurch diese in die weniger aktive D-Form überführt und die Glycogen-Synthese unterbrochen wird. Die D-Form benötigt zur Aktivierung Glucose-6-Phosphat.

Eine Reduzierung des Glycogengehaltes im Muskel von Lämmern nach Cimaterolapplikation (Allen et al., 1985) und im Muskel von Kälbern nach Salbutamol- (Garssen et al., 1995) bzw. Clenbuterolgabe (Maltin et al., 1990), gibt Hinweise auf eine Steigerung der Glycolyse. Ähnliches bestätigen auch die Untersuchungen von Dazzi et al. (1991) bei Schweinen nach Gabe von Salbutamol. Allerdings änderten sich die Parameter der Glycolyse (Reduzierung des Glycogen-, Glucose- und Glucose-6-Phosphatgehaltes sowie Anstieg des Laktatgehaltes) nur gegenüber denen der weiblichen Kontrolltiere. Die männlichen Kontrolltiere lagen eher im Bereich der mit Salbutamol behandelten Tiere.

Von einer Entleerung des Leberglycogens sprechen Biolatti et al. (1994) nach einer Behandlung von Kälbern mit Clenbuterol. Rosi et al. (1993) stellten bei mit Clenbuterol behandelten Kaninchen eine Verringerung des Leberglycogens um 19 %, eine Erhöhung des Gesamtproteins um 10 %, von RNA um 20 % und der Alanin-Amino-Transferaseaktivität um 34 % fest. Diese stoffwechsellmobilisierenden Vorgänge führten zur Reduzierung des Lebergewichtes. Im Muskel stellten Hamby et al. (1986) eine zwei- bis dreifach höhere Glycogensynthese und einen 60 % höheren CO₂-Gehalt bei Schafen fest, denen Clenbuterol über 40 Tage verabreicht wurde. Dies deutet auf eine durch gesteigerten Metabolismus bedingte Muskelfaserhypertrophie hin.

Proteinstoffwechsel im Muskel

Die beiden biologischen Prozesse, die das Muskelwachstum hauptsächlich beeinflussen, sind der Proteinansatz und die Zellproliferation. Der Proteinansatz wird durch Proteinsynthese und Proteinabbau bestimmt (Allen et al., 1979). Die Protein-Biosynthese erfolgt durch Transkription der DNA, deren Information über die mRNA weitergegeben und nach Übersetzung durch die Ribosomen zum Aufbau der Peptidkette-Kette mit einer bestimmten Aminosäuresequenz verwendet wird (Bergen, 1974). β_2 -Agonisten scheinen nur geringen oder keinen Einfluss auf die Proteinsynthese zu haben (Reeds et al., 1986; Rogers & Fagan, 1991). Demgegenüber wurde eine spezielle Erhöhung der myofibrillären Proteinsynthese von Smith et al. (1987b) bei mit Ractopamin behandelten Rindern festgestellt. Eine leichte Erhöhung der Protein- und RNA-Konzentration im Muskel wurde von Maltin et al. (1990) bei Kälbern nach Clenbuterolgabe gefunden. Höhere Quotienten im Verhältnis von Muskel -Protein/DNA und -Protein/RNA wiesen Garssen et al. (1995) nach. Eine Cimaterol- bzw. Clenbuterol-verabreichung an Lämmer bzw. Enten führte zu einer signifikanten Erhöhung des RNA/DNA-Verhältnisses (Kim et al., 1987a bzw. Zhou & Han, 1994) bzw. zu einem schnelleren Zuwachs an Muskel-RNA und -Protein ohne gleichzeitige Erhöhung des Muskel-DNA-

Gehaltes (Beermann et al., 1987). Beermann et al. (1987) berichteten, dass diese Ergebnisse auf eine Muskelfaservergrößerung (Hypertrophie) und nicht auf eine erhöhte Einlagerung von Satelliten-Zellkernen (Hyperplasie) zurückzuführen waren.

Eine Erhöhung des Muskelgewichtes infolge einer Muskelfaserhypertrophie wurde in folgenden Versuchen bestätigt: Beermann et al. (1987) wiesen bei Lämmern eine Erhöhung des Muskelgewichts um 22-24 % nach Gabe von Cimaterol nach. Diese wurde hauptsächlich durch eine Muskelhypertrophie erreicht, die sich in einer Erhöhung des Muskelfaserquerschnitts um 29-30 % zeigte. Bei mit Cimaterol behandelten Lämmern bestätigten Kim et al. (1987b) die Muskelhypertrophie, welche auch Maltin et al. (1990) bei Kälbern, Miller et al. (1988) bei Färsen und Hamby et al. (1986) bei Lämmern nach Verabreichung von Clenbuterol feststellten. Zeman et al. (1988) konnte eine Clenbuterol-induzierte Muskelhypertrophie bei Ratten histochemisch nachweisen. Übereinstimmend wurde beschrieben, dass die Hypertrophie hauptsächlich bei den langsamen und durch den hohen Myoglobingehalt roten Typ II- Muskelfasern mit langer Kontraktionsdauer und niedriger Energieverwertung und weniger bei den durch den geringen Myoglobingehalt weißen Typ I- Muskelfasern mit kurzer Kontraktionsdauer und hoher Energieverwertung festgestellt wurde (Hamby et al., 1986; Beermann et al., 1987; Kim et al., 1987b; Miller et al., 1988). Dabei war die Hypertrophie der Typ II- Muskelfasern zwei- bis dreimal stärker als die der Typ I- Fasern und der Anteil an Typ I- Fasern signifikant verringert. Die Hypertrophie überwiegend nur eines Muskelfasertyps erklärt, warum Gewichtszunahmen einzelner Muskeln unterschiedlich hoch sind. So zeigte der Plantaris-Muskel mit überwiegend Typ II- Fasern höhere Gewichtszunahmen als der Soleus-Muskel mit überwiegend Typ I- Fasern (Kim et al., 1987b). Außerdem wurde die Umkehrung von Typ II- in Typ I- Muskelfasern bei Schafen durch Cimaterolgabe unter restriktiven Fütterungsbedingungen gehemmt (Kim et al., 1987c).

Der Einfluss von β -Agonisten erstreckt sich jedoch hauptsächlich auf eine Verminderung des Proteinabbaus. Cimaterol konnte in vitro den Proteinabbau um 21 % verringern (Rogers & Fagan, 1991). Proteine werden durch proteolytische Enzyme zu Aminosäuren abgebaut, die wieder dem Aminosäure-, „Pool“ im Blut zugeführt werden. β -Agonisten beeinflussen das Ca-abhängige Proteinasesystem, in welchem die Enzyme Calpain I und II proteolytisch wirken und das Enzym Calpastatin als Proteinasehemmer die Proteolyse hemmt (Bardsley et al., 1992). Proteolytisch wirkt auch die lysosomale Protease Kathepsin B. Nach Verabreichung von β_2 - adrenergen Agonisten an Lämmer bzw. Schafe stieg die Calpain II- und Calpastatin-Aktivität im Muskel um 30 bis 100 %, bei leichtem Rückgang der Calpain I-Aktivität (ca. 10-15 %) und einem Rückgang der Kathepsin B-Aktivität um ca. 30 %. Die für einen Rückgang des Proteinabbaus sprechenden Ergebnisse wurden von Forsberg et al. (1987) mit Cimaterol, von Higgins et al. (1988) mit Clenbuterol und von Kretchmar et al. (1989 und 1990) mit L-

644,969 erzielt. Auch Untersuchungen von Bardsley et al. (1992) an Rindern, Schafen, Hühnern und Ratten bestätigten diese Ergebnisse durch Gabe von Clenbuterol oder Cimaterol.

Aminosäuren können auf verschiedenste Weise abgebaut werden. Beim Abbau der Aminosäuren über Desaminierung wird der Stickstoff über Glutaminsäure gebunden und über die Glutamat-Dehydrogenase als Ammoniak (NH_3) freigesetzt, der unter anderem über die Bildung von Harnstoff ausgeschieden wird. Clenbuterolgaben über mehrere Tage führten zu einer erhöhten Stickstoff-Retention bei männlichen Lämmern (MacRae et al., 1988) und Schweinen (Jentsch et al., 1991). Dies erreichten auch Kim et al. (1987d) mit Cimaterol bei Lämmer. Der oxidative Abbau von Leucin war signifikant verringert (MacRae et al., 1988). Eine erhöhte Stickstoff-Retention nach Clenbuterolgabe fanden auch Williams et al. (1987) bei Kälbern und Herbert et al. (1985) bei Lämmern. Einen verringerten Aminosäureabbau wiesen Hovell et al. (1988) durch einen reduzierten endogenen Stickstoffverlust nach Clenbuterol- und Cimaterolgabe bei Schafen nach. Ein weiteres Indiz für den verminderten Aminosäure-Abbau ist die signifikant verringerte Muskelglycogen-Konzentration nach Clenbuterolbehandlung von Kälbern (Maltin et al., 1990).

Blutparameter

Generell kann festgestellt werden, dass eine akute Verabreichung von β -Agonisten kurzfristig zu einer Mobilisierung der Energiereserven führt. Dies wird durch den kurzzeitigen Anstieg unveresteter Fettsäuren, Glukose und Laktat durch verschiedene Catecholamine bei Rindern (Blum et al., 1982; Hoey et al., 1995), durch Isoprenalin bei Schweinen (Brenner et al., 1981) sowie von Insulin durch Terbutalin bei Mäusen (Ahrén & Lundquist, 1981) im Blutplasma deutlich. Nach längerer Cimaterol-Behandlung stellten Beermann et al. (1986 und 1987) bei Lämmern eine Senkung der Insulinkonzentration im Plasma um 50-55 % fest. Bruckmaier & Blum (1992) beschrieben ebenfalls erhöhte Glucose-, Acetat- und Insulinkonzentrationen und eine geringere Sauerstoffkonzentration im Blut von Kälbern, die einen Tag mit Clenbuterol behandelt wurden. Nach 14 Tagen wurden, bedingt durch die Desensibilisierung der Rezeptoren, kaum noch Unterschiede zu den Ausgangswerten festgestellt. Behandlungen von Ratten mit Clenbuterol über 14 Tage senkten ebenfalls die Serumkonzentrationen von unveresterten Fettsäuren, Glukose und Insulin (Greife et. al., 1989), β_1 -Agonisten erhöhten dagegen die Insulinkonzentration im Plasma (Ahrén & Lundquist, 1981). Terbutalin löste einen signifikanten Anstieg des cAMP-Gehaltes im Blutplasma beim Menschen aus (Endres, 1976).

2.4 ANWENDUNGSGEBIETE

2.4.1 Therapeutische Anwendung

Als Therapeutika sind β_2 -adrenerge Agonisten vor allem wegen ihrer broncholytischen und tokolytischen Wirkung von Bedeutung. Aufgrund ihrer broncholytischen Wirkung können alle akuten bis chronischen Atemwegserkrankungen, die im Zusammenhang mit Bronchospasmen auftreten, behandelt werden. Wegen ihrer tokolytischen Wirkung werden β_2 -Agonisten vorwiegend als Wehenhemmer und allgemein zur Uterusrelaxation verwendet. Außerdem finden sie bei der Therapie von Durchblutungsstörungen vor allem bei Schockzuständen Anwendung (Ungemach, 1997).

Broncholyse

Durch Stimulierung der β_2 -adrenergen Rezeptoren des Bronchialgewebes kommt es zu einer gesteigerten der cAMP-Synthese und zu einem vermehrten Transport von Ca^{2+} in die Zisternen des sarkoplasmatischen Retikulums, wodurch eine Muskelrelaxanz ausgelöst wird (Endres, 1976). 6-8 Stunden nach Clenbuterolgabe wurde bei Kälbern eine Erhöhung der Ziliaraktivität und eine Steigerung der sekretolytischen Aktivität festgestellt (Verhoeff et al., 1986). Außerdem kommt es zur Hemmung der Synthese und Freisetzung von Histamin (Ungemach, 1997).

Clenbuterol verbesserte die Atmung durch Verringerung der Atemfrequenz und -tiefe bei Ferkeln mit Pneumonien (Denac et al., 1984) und Pferden mit Bronchitiden und Lungenemphysemen (Denac et al., 1981). Bei Pferden mit Erkrankungen des Respirationstraktes zeigte Clenbuterol die besten und Orciprenalin kaum therapeutische Effekte. Außer den genannten β -Agonisten wurden noch Salbutamol und Ephedrin getestet, deren therapeutische Wirksamkeit zwischen der von Clenbuterol und Orciprenalin lag (Corbella, 1978).

Tokolyse

Wenn auch der biochemische Mechanismus des Zusammenspiels zwischen β_2 -Agonist und spezifischem Aktivator, der zur Uterusrelaxation führt, noch nicht genau verstanden worden ist, so scheint doch klar zu sein, dass auch in diesem Fall cAMP als „second messenger“ zur Aktivierung der Proteinkinase eine Rolle spielt, da es zur Relaxation am Myometrium nach Erhöhung des cAMP-Spiegels kommt (Litime et al., 1989). Litime et al. (1989) stellten in ihren Untersuchungen fest, dass der Mechanismus der Stimulierung der Adenylatcyclase-Aktivität des Myometriums am Ende der Trächtigkeit verloren geht. Korenman et al. (1974)

fürten dies auf die Wirkung von Oxytocin zurück, welches nur am Ende der Trächtigkeit die Isoproterenol-bedingte Uterusrelaxation hemmen konnte.

Eine Uterusrelaxation wurde bereits 3 Minuten nach intravenöser Clenbuterolgabe bei Kühen erreicht (Hassett & Sloss, 1984) und hielt nach intramuskulärer Injektion 1-2 Stunden an (Balla & Tschirn, 1984). Die Verabreichung von Clenbuterol zu Beginn der Geburt (Zervixkanal bereit 5 cm geöffnet) führte bei Kühen zur Verzögerung während der Eröffnungsphase, wobei die Vorgänge zur Erweiterung der Geburtswege unbeeinflusst blieben (Putnam et al., 1985). Keinen Einfluss hatte Clenbuterol dagegen auf die Austreibungsphase (mit Einsetzen der Presswehen) und auf die Nachgeburtsperiode (Abgang der Plazenta). Geburtsverzögerungen konnten auch Jatsch et al. (1981) beim Schaf und Arbeiter & Thurnher (1977) und Ballarini et al. (1980) bei Kühen nachweisen. Nachteilige Folgen für Kälber oder Lämmer waren nicht zu beobachten (Arbeiter & Thurnher, 1977; Jatsch et al., 1981; Putnam et al., 1985).

2.4.2 Verbesserung der Mastleistung und der Schlachtkörperqualität

Die Kenntnis um die Hauptwirkung von β -adrenergen Agonisten als „repartitioning agents“ (Umverteiler) ließ die Frage nach den Möglichkeiten der Nutzung dieser Stoffwechselfvorgänge zur Verbesserung der Fleischqualität von Schlachttieren bei der Lebensmittelgewinnung aufkommen. Für den Verbraucher steht der Verzehr von möglichst magerem Fleisch im Vordergrund des Interesses (Hanrahan, 1987). Die Fleischerzeuger sind daher bemüht, zur besseren Einstufung der Schlachtkörper den Magerfleischanteil zu erhöhen und den Fettanteil zu senken.

Die Verbesserung des Wachstums und der Schlachtkörperqualität von landwirtschaftlichen Nutztieren bei effizienter Ausnutzung des Futters über β_2 -adrenerge Agonisten ist inzwischen Thema zahlreicher Veröffentlichungen. Salobir (1990) hat eine Literaturstudie über die Wirkung von β_2 -Agonisten bei Schweinen angefertigt. Er hat 31 Versuche verschiedener Autoren der Jahre 1984-1989 nach unterschiedlichen Mastparametern wie Mastperiode, tägliche Zunahme, Futtermittelverwertung, Rückenspeckdicke, Rückenmuskelfläche ausgewertet und in Bezug zum getesteten β_2 -Agonisten und zur Dosis gesetzt.

Rinke (1990) hat über den gleichen Zeitraum und zum Teil mit den gleichen Parametern die Arbeiten von 25 Autoren, welche die Mastwirkung von β_2 -Agonisten an Rindern, Schweinen, Schafen und am Geflügel testeten, ausgewertet.

Tabelle 4 fasst einige neuere Arbeiten zusammen, die in den Literaturstudien von Salobir (1990) und Rinke (1990) noch nicht berücksichtigt wurden.

Tabelle 4 Wirkung von β -Agonisten auf die Futterverwertung und auf verschiedene Schlachtparameter (Angaben in %)

Tierart	β_2 -Agonist	Dosis [mg/kg]/ Tier/ Tag	Behandlungs- zeitraum	Futter- ver- wertung	Schlacht- körper- gewicht	Muskel- stärke (D) bzw. Gewicht (G)	Fettdicke (D) bzw. Gewicht (G)
Wellenreiter & Tonkinson (1990)							
Truthühner	Ractopamin	11	11.-16. Woche		+2,4	+1,3 G	-14,7 G
		22	und		+6,1	+1,4 G	-11,7 G
		44	13.-18. Woche		+6,6	+1,5 G	-16,2 G
Dean & Dalrymple (1988)							
Enten	Cimaterol	0,25	14.-44. Tag	-2,6	+1,0	+9,6 G	-9,2 G
		0,5		-5,5	-1,5	+15,15 G	-15,3 G
		1,0		-5,8	-8,1	+11,5 G	-24,8 G
Zhou & Han (1994)							
Enten	Clenbuterol	1, 2, 3, 5	über 25 Tage			+10 bis +31 G	-8 bis -37 G
Merkley & Cartwright (1988)							
Broiler	Cimaterol	0,25	4.-16. Woche				
			8. Woche		+0,5		-3,525 G
			12. Woche		+0,4		-21,83 G
			16. Woche		+0,6		-14,83 G
Williams et al. (1987)							
Kälber	Clenbuterol	0,004	über 105 Tage		+4,4ns		-7,2 ns G
		0,04	über 105 Tage		+8,1ns		-38,5 G
Garssen et al. (1992)							
Kälber	Clenbuterol	1,6	über 4 Wochen			+11,0 G	-5 ns G
	Salbutamol	100*	über 4 Wochen			+19,0 G	-8,0 ns G
Elliott et al. (1993a)							
Kälber	Clenbuterol	0,016	über 30 Tage			+3-4ns D	-40 D
Ricks et al. (1984)							
Rinder	Clenbuterol	10*	über 98 Tage			+11,0 D	-35 D -23 G
		500*	über 98 Tage			+16,0 D	-42 D -33 G
Miller et al. (1988)							
Rinder	Clenbuterol	10*	über 50 Tage		+0,7ns	+15,5 D	-40 D
Rikhardsson et al. (1991)							
Lämmer	Cimaterol	0,5	über 70 Tage	-53	+21,7	+50 D	-42,1 D
Dazzi et al. (1991)							
Schweine	Salbutamol	2	von ca. 30-160 kg (206 Tage)	-9,7	+3,0	+6,7 D	-18,5 D
Warriss et al. (1990)							
Schweine	Salbutamol	3	von ca. 32-85 kg		+2,4	+11,0 D	-17,0 D
McElligott et al. (1989b)							
Ratten	Clenbuterol	20	a) über 14 Tage	-1,0		+14,5 G	
			b) über 14 Tage (2 Tage mit und 2 Tage ohne Clenbuterol)	-5,5		+16,1 G	

ns = nicht signifikant

* Dosis in mg/Tier/Tag

Bei Kaninchen führte die Verabreichung von Clenbuterol und Salbutamol über 3 bzw. 4 Wochen zu höheren Gewichtszunahmen je nach Dosis von 6,2-24,5 % bzw. 12,8 % und zu einer besseren Futtermittelverwertung von 1,2-21,7 % bzw. 15,7 % (Pialorski et al., 1992; Hulot et al., 1996).

Positive Wirkungen konnten bei allen landwirtschaftlichen Nutztieren erzielt werden, wobei es hinsichtlich der Effektivität Unterschiede gibt. Nach Hanrahan (1989) und Peters (1989) nimmt die Effektivität wie folgt ab: Wiederkäuer > Schweine > Geflügel. Dieser Vergleich kann nur eine Tendenz ausdrücken, da eine direkte Gegenüberstellung der Tierarten aufgrund der unterschiedlichen Versuchsansätze (s. auch Tabelle 4) kaum möglich ist. Die Ergebnisse wurden beeinflusst durch:

- den eingesetzten β_2 -Agonisten - nach Salobir (1990) erreicht Ractopamin bei Schweinen erst in 20fach höheren Dosierungen die gleiche Wirksamkeit wie Clenbuterol -,
- Dosierung und Applikationsdauer,
- Rasse, Alter und Gewicht der Tiere - ältere und damit schwerere Tiere haben in der Regel bereits größere Fettreserven, die mobilisiert werden können -,
- das Geschlecht der Tiere - weibliche Tiere haben nach Dazzi et al. (1991) meist bessere Zunahmen -,
- unterschiedliche Fütterungs- und Haltungsbedingungen,
- die Art der angewendeten Untersuchungsmethoden zur Berechnung der verschiedenen Fütterungs- und Schlachtparameter.

Aus den genannten Veröffentlichungen und aus Tabelle 4 ist übereinstimmend ersichtlich, dass durch β_2 -Agonisten eine bessere Futtermittelverwertung und ein höherer Muskelzuwachs bei geringem Fettansatz erreicht wird. Höhere Ausschlachtgewichte bei besserer Qualitätseinstufung der Schlachtkörper und ein geringerer Futtermittelverbrauch machen β_2 -Agonisten für die Fleischproduktion interessant (Hanrahan et al., 1987a und b). Die Dosierungen, die zur Verbesserung der genannten Fütterungs- und Schlachtparameter führten, lagen um ein Vielfaches über der für die therapeutische Behandlung mit Clenbuterol festgelegten Dosierung. Besonders hohe Dosen wurden dem Geflügel verabreicht, wodurch die Effekte noch ausgeprägter waren (s. Tabelle 4). Obwohl bei den zur Verfügung stehenden Veröffentlichungen zum Teil verschiedene Dosierungen getestet wurden, stand bei keinem der beschriebenen Versuche die Frage nach der Mindestdosis zum Erreichen der genannten Wachstumseffekte im Vordergrund. Eine Dosisabhängigkeit ist anhand der Ergebnisse zu erkennen. Williams et al. (1987) erreichten zwar bei Kälbern bereits einen geringen „repartitioning effect“ bei einer 2,5fachen therapeutischen Dosis, statistisch signifikant war dieser Effekt aber erst bei der 25fachen therapeutischen Dosis. Elliott et al. (1993a) wiesen eine um 40 % verringerte Rückenspeckdicke und eine erhöhtes, aber nicht signifikantes Muskelwachstum bei einer zehnfach höheren Dosis nach. Die Rückenspeckdicke der Tiere

blieb auch ohne Clenbuterolzugabe für ca. 30 Tage auf ähnlich niedrigem Niveau, nahm dann langsam zu und erreichte nach weiteren 90 Tagen ähnliche Werte wie die Kontrolltiere. Ricks et al. (1984) konnten bei den Mastrindern, die über 98 Tage bis zum Mastende eine Dosis von 500 mg pro Tier und Tag erhielten, einen besseren „repartitioning effect“ feststellen, als bei den Tieren, die eine Dosis von 10 mg pro Tier und Tag erhielten. Das entspricht bei den ca. 350 kg schweren Tieren einer ca. 900 bzw. 18fachen therapeutischen Dosis. Auch Miller et al. (1988) beschrieben eine verringerte Speckdicke bei vergrößertem Longissimusmuskel und besserer Futterverwertung durch die Gabe einer ca. 17fachen therapeutischen Clenbuteroldosis. Hohe Clenbuteroldosen verursachen eine Verringerung der Magen-Darmperistaltik, des Magensaftvolumens und der Säureproduktion bei Ratten (Kopitar & Zimmer, 1976b, Engelhardt, 1976), bei Hunden (Kopitar & Zimmer, 1976b) und bei Mäusen (Engelhardt, 1976). Dies könnte als eine Ursache für die bessere Futtermittelausnutzung angesehen werden.

2.4.3 Unerwünschte Wirkungen

Hohe Dosen von Clenbuterol führten bei Schafen in den ersten drei Tagen zu einer Erhöhung der Herzfrequenz bei verringertem Blutdruck und vermindertem Appetit (Brockway et al., 1987). Auch Bruckmaier & Blum (1992) wiesen am ersten Tag eine starke Erhöhung der Atemfrequenz, des Atemminutenvolumens und der Herzfrequenz bei mit Clenbuterol behandelten Kälbern nach. Nach 14 Tagen waren die Werte nur noch leicht erhöht. Die genannten Kreislaufeffekte hängen zum großen Teil mit der immer noch vorhandenen Restwirkung β_2 -selektiver Agonisten auf die β_1 -Rezeptoren zusammen, welche hauptsächlich im Herzmuskel lokalisiert sind (Hoey et al., 1995). Nach Verabreichung von hohen Clenbuteroldosen an Rinder wiesen Hoey et al. (1995) eine durch β_1 -Rezeptoren vermittelte Verminderung des diastolischen Blutdrucks und eine Erhöhung der Herzfrequenz als Reaktion auf den Blutdruckabfall nach. Als Ursache wurde eine durch Freisetzung von Noradrenalin hervorgerufene Stimulierung der kardialen β_1 -Rezeptoren und die Hemmung des cholinergen Inputs zum Herzen über eine Aktivierung der Barorezeptoren angesehen. Durch Antagonisten konnten die Kreislaufeffekte ohne Auswirkung auf den „repartitioning effect“ reduziert oder aufgehoben werden. Eine geringe Restwirkung auf die β_1 -Rezeptoren konnte bei allen bisher synthetisierten β_2 - Agonisten nicht verhindert werden (Engelhardt, 1972; Keck et al., 1972).

Bei Hunden wurden als weitere Nebenwirkung das Auftreten von mikroskopisch kleinen Läsionen im linken Ventrikel des Herzmuskels beobachtet, die dosisunabhängig waren. Als Ursache wurde die starke Tachykardie aufgrund der Blutdrucksenkung angegeben, die bei Hunden schon bei niedrigen Dosen auftritt (Ueberberg et al., 1976). Außerdem wurden bei Hunden und Pferden das Auftreten von Herznekrosen nachgewiesen (Ungemach, 1997).

2.5 GESETZLICHE GRUNDLAGEN FÜR DIE ANWENDUNG VON β_2 -AGONISTEN

In der Humanmedizin sind eine Reihe von β_2 -Agonisten wie Clenbuterol (z.B. Contraspasmin[®], Spiropent[®]), Terbutalin (z.B. Bricanyl[®], Contimit[®], Terbul[®]), Fenoterol (Partusisten[®], Berotec[®]) und Salbutamol (z.B. Volmac[®], Salmundin[®], Sultanol[®]) als Broncholytika und Buphenin (Apoplectal[®]) als Tokolytikum und zur Durchblutungsverbesserung im Handel (Rote Liste, 1998), wobei die Broncholytika gelegentlich auch beim Pferd angewendet wurden (Löscher, 1997). Clenbuterol und Isoxsuprin sind die einzigen β_2 -Agonisten, die als Tierarzneimittel im Handel sind.

Als Broncholytikum wird Clenbuterol für Pferde unter den Handelsnamen Ventipulmin[®], Venti Plus[®] und Clenovet[®] geführt. Es soll zweimal täglich oral über 10-14 Tage in Dosierungen verabreicht werden, die einer Menge von 0,8 μg Clenbuterolhydrochlorid pro Kilogramm Körpergewicht entsprechen. Die Wartezeit beträgt für essbares Gewebe 28 Tage (Petrausch, 1998a, b und c).

Als Tokolytika sind Clenbuterol unter dem Namen Planipart[®] und Isoxsuprin unter den Namen Uterusrelaxans[®] und Duphaspasmin[®] im Handel. Clenbuterol darf zur intravenösen und intramuskulären Anwendung bei Rindern und Isoxsuprin zur intramuskulären Anwendung bei Rindern, Pferden, Hunden und Katzen angewendet werden. Die Anwendung sollte kurzzeitig über 1-2 Tage erfolgen. Für Clenbuterol ist eine Dosierung von 0,8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG angegeben und für Isoxsuprin bei Rindern und Pferden von 70-100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG und bei Hunden und Katzen von 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG. Die Wartezeit beträgt bei Clenbuterol für essbares Gewebe 12 Tage und für Milch 3 Tage und bei Isoxsuprin für essbares Gewebe 2 Tage und für Milch 1 Tag (BgVV, 1998a und b; Petrausch, 1998a, b und c; Löscher, 1997; Kroker, 1997).

Zur Zeit bestehen allerdings nur noch eingeschränkte Möglichkeiten, Clenbuterol und Isoxuprin bei Haus- und Nutztieren (Kühen und Pferden) für therapeutische Zwecke anzuwenden.

Die Diskussion um eine weitgehende Anwendungsbeschränkung von β -Agonisten bei lebensmittelliefernden Tieren wurde bereits 1993 durch die Europäische Kommission in Gang gesetzt (Animal Pharm, 1993a und b), nachdem europaweit immer wieder Fälle von illegaler Anwendung hauptsächlich von Clenbuterol zur Leistungssteigerung bekannt geworden sind und die Möglichkeiten der Überwachung begrenzt waren. Durch die Richtlinie 96/22/EG des Rates vom 29. April 1996 wurde dann die Anwendungsbeschränkung für β -Agonisten gesetzlich fixiert.

Das Verbot wurde mit dem hohen Missbrauchspotential von β -Agonisten und der Tatsache legitimiert, dass sie die menschliche Gesundheit ernsthaft gefährden können. β -Agonisten standen in der Tierproduktion in großem Umfang zur Verfügung. Insbesondere die legale Anwendung von Clenbuterol war kaum zu kontrollieren.

In nationales Recht wurde die Richtlinie fristgerecht mit der Verordnung über Stoffe mit pharmakologischer Wirkung und mit der Verordnung über das Verbot der Verwendung bestimmter Stoffe bei der Herstellung von Arzneimitteln zur Anwendung bei Tieren umgesetzt.

Durch die Verordnung (EG) Nr. 1312/96 wurde Clenbuterol in den Anhang III der Verordnung (EWG) 2377/90 aufgenommen und Höchstmengen (MRLs) für folgende Anwendungsbereiche festgelegt, die zunächst bis zum 01.07.2000 gelten:

- Rinder: (Anwendung: - nur als Tokolytikum bei gebärenden Kühen):

MRL	⇔	0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$	für Leber und Niere
		0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$	für Muskel
		0,05 $\mu\text{g}/\text{kg}$	für Milch

- Pferde: (Anwendung: - nur als Tokolytikum und bei Erkrankungen der Atemwege):

MRL	⇔	0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$	für Leber und Niere
		0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$	für Muskel

Isoxuprin wurde durch die Verordnung (EG) Nr. 748/97 in den Anhang II der Verordnung (EWG) 2377/90 aufgenommen, in dem Stoffe aufgeführt sind, für die keine Höchstmengen für Rückstände gelten. Angewendet darf es nur für therapeutische Zwecke gemäß der Richtlinie 96/22/EG bei Rindern und Pferden werden.

Beim Europäischen Gerichtshof ist derzeit eine Klage des Herstellers von clenbuterolhaltigen Tierarzneimitteln (Boehringer, Ingelheim) gegen die Richtlinie 96/22/EG und die Verordnung (EG) Nr. 1312/96 anhängig, so dass die Zulassung für einige clenbuterolhaltige Präparate des Herstellers zunächst bis zum 31.12.1999 ruht (BgVV, 1998c).

2.6 RÜCKSTANDSÜBERWACHUNG

Um einen einheitlichen Verbraucherschutz innerhalb des Europäischen Binnenmarktes ab dem Jahre 1993 sichern zu können und um Wettbewerbsverzerrungen vorzubeugen, wurden innerhalb der Europäischen Union verschiedene Richtlinien erlassen. Ein wichtiger Schritt war hierbei die Harmonisierung der Rückstandskontrollen (Jülicher, 1991).

Im Jahr 1985 wurde die Richtlinie 81/602/EWG, welche das Verbot zur Anwendung bestimmter Stoffe mit hormonaler bzw. thyreostatischer Wirkung innerhalb der Europäischen Union (EU) regelt, durch die Richtlinie 85/358/EWG ergänzt und mit dieser erstmals allgemeine Kriterien für eine einheitliche Kontrolle festgelegt. Im Vordergrund stand die Überwachung der Einhaltung des Verbotes der Verwendung bestimmter Stoffe und die Kontrolle der Höchstwerte bei zugelassenen Stoffen. Die Richtlinie 86/469/EWG legte danach die genauen Modalitäten für Rückstandsuntersuchungen bei Tieren und frischem Fleisch fest. Dies betraf die Anzahl der zu untersuchenden Proben bei Rindern, Schweinen, Schafen, Ziegen und Pferden, das Spektrum der zu untersuchenden Stoffe und das Vorgehen nach positiven Befunden. Die Vorgaben werden seitdem in einem „Nationalen Rückstandskontrollplan“ umgesetzt. Entsprechend der Richtlinie wurde in jedem EU-Mitgliedstaat eine Zentralstelle mit der Koordinierung der Rückstandskontrolle, der Erstellung des Rückstandskontrollplanes und der Erfassung von Untersuchungsergebnissen betraut. Für Deutschland ist diese seit 1989 im ehemaligen Bundesgesundheitsamt und jetzigen Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin angesiedelt.

Ein weiterer wichtiger Schritt zur Verbesserung der Rückstandsüberwachung wurde im Jahr 1996 mit der Verabschiedung der Richtlinien 96/22/EG und 96/23/EG erreicht. Die Richtlinie 96/22/EG dehnt das Verbot der Verwendung bestimmter Stoffe mit hormonaler bzw. thyreostatischer Wirkung auf die meisten β -Agonisten aus, die Richtlinie 96/23/EG dient vor allem der verbesserten Kontrolle der Erzeugerbetriebe und der Erweiterung der Kontrollen auf Geflügel, Aquakulturen, Wild und Kaninchen sowie auf tierische Erzeugnisse wie Milch, Eier und Honig. Außerdem wurden die Untersuchungszahlen erhöht und das Substanzspektrum erweitert. Jedes Drittland (nicht EU-Mitgliedstaat) wird verpflichtet, bei Exporten in die EU einen Rückstandskontrollplan nach den Vorgaben der Richtlinie 96/23/EG vorzulegen und entsprechende Untersuchungen durchzuführen.

Die Notwendigkeit von Maßnahmen zur Verbesserung der Rückstandsüberwachung wird auch anhand der vorliegenden Ergebnisse von Deutschland und der EU-Mitgliedstaaten in den Tabellen 5 und 6 deutlich. Tabelle 5 gibt einen Überblick über Clenbuterolrückstände bei landwirtschaftlichen Tieren anhand der in den Jahren 1994-1997 in Deutschland nach

Rückstandskontrollplan durchgeführten Untersuchungen. Vor allem bei Kälbern konnte immer wieder Clenbuterol nachgewiesen werden.

Tabelle 5 Clenbuterolergebnisse der in Deutschland nach Rückstandskontrollplan in den Jahren 1993-1997 durchgeführten Rückstandsuntersuchungen

Jahr	Kalb			Rind			Schwein			Schaf			Geflügel		
	N	P	in %	N	P	in %	N	P	in %	N	P	in %	N	P	in %
1993	1708	173	10,1	5077	10	0,2	376	1	0,3	277	-	0	-	-	-
1994	1357	82	6,0	4261	6	0,1	980	-	0	214	-	0	-	-	-
1995	1518	73	4,8	2785	11	0,4	1026	6	0,6	249	1	0,4	843	-	0
1996	1787	67	3,7	2553	6	0,2	876	3	0,3	230	-	0	842	-	0
1997	2091	67	3,2	2851	1	0,04	848	3	0,4	200	-	0	1470	-	0

N = Anzahl Untersuchungen

P = Anzahl Tiere bei denen Clenbuterol nachwiesen wurde

Um einen Überblick unter anderem über die Rückstandssituation von Clenbuterol zu erhalten, hat der belgische Verbraucherverband „Test-Achats“ mit Unterstützung der Verbraucherschutzabteilung der Europäischen Kommission im Jahr 1994 fast 1.000 Lebern von Rindern nach einem europaweit einheitlichen Stichprobenverfahren im Handel gekauft und untersucht (Remy & Debeuckelaere, 1994). Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 aufgeführt. Zum Vergleich sind die Ergebnisse der offiziellen Untersuchungen der einzelnen Mitgliedstaaten von Rinderlebern nach jeweiligem Rückstandskontrollplan 1994 beigefügt (Jülicher, 1995). Die Daten belegen, dass in fast allen Mitgliedstaaten Clenbuterol missbräuchlich eingesetzt wird, wobei Spanien und Belgien besonders auffielen. Diese Ergebnisse wurden zum Anlass genommen, die Vorschläge der Europäischen Kommission über ein vollständiges Clenbuterolverbot sowie eine Verschärfung der Kontrollen und Sanktionen neu zu diskutieren.

Tabelle 6 Clenbuterolergebnisse der im Jahr 1994 europaweit entnommenen Leberproben von Rindern (Untersuchung belgischen Verbraucherverbandes „Test-Achats“) sowie Untersuchungen der Leberproben von Rindern nach Rückstandskontrollplan des jeweiligen Mitgliedstaates von 1994

Mitgliedstaat	„Test-Achats“-Studie			Rückstands- kontrollplan in %
	Anzahl Proben	Positive	in %	
Belgien	60	14	23,3	3,0
Dänemark	60	-	-	*
Deutschland	121	3	2,5	2,0
Frankreich	94	12	12,8	*
Griechenland	60	3	5,0	*
Großbritannien	120	4	3,3	0,1
Irland	60	1	1,7	0,0
Italien	122	10	8,2	*
Luxemburg	31	3	9,7	*
Niederlande	60	6	10,0	0,8
Portugal	60	4	6,7	*
Spanien	88	32	36,4	0,0
Summe	936	92	9,8	-

* Untersuchungsergebnisse liegen nicht vor

2.7 MISSBRAUCH VON CLENBUTEROL

Durch Zufütterung von β_2 - Agonisten können infolge des geringeren Futtermittelsverbrauchs und der verbesserten Schlachtkörperqualität erhebliche wirtschaftliche Gewinne erzielt werden. So berechneten Salobir et al. (1990) nach Versuchen, in denen Schweinen in der Endmast Cimaterol gefüttert wurde, einen Mehrgewinn je Schlachtkörper von durchschnittlich 20 DM. Greife & Berschauer (1988) und Meisinger (1989) schätzten den Gewinn anhand einer Modellrechnung auf 19 DM bzw. 6-11 US\$ je Schwein, wobei sowohl die Futtereinsparung als auch die bessere Handelsklasseneinstufung Berücksichtigung fanden. In Spanien wurde sogar von einem Muskelzuwachs von 20 % nach Verabreichung von β -Agonisten ausgegangen, wodurch einen zusätzlichen Gewinn von ca. 150 US\$ je Tier erreicht werden würde (WHO Newsletter, 1992). Diese wenigen Beispiele machen bereits auf das hohe Missbrauchspotential aufmerksam.

In den letzten Jahren konnte der europaweite illegale Einsatz von β -Agonisten nicht nur über die amtliche Rückstandsüberwachung, sondern auch immer wieder durch Fälle von Intoxikationen beim Menschen nachgewiesen werden. In Deutschland wurden bisher keine Fälle von Intoxikationen beim Menschen durch β -Agonisten bekannt.

Dies belegen die folgenden Fälle von Intoxikationen beim Menschen und folgende größere Fälle, bei denen der Missbrauch von β_2 -Agonisten bei lebensmittelliefernden Tieren nachgewiesen werden konnte:

1988

Deutschland:- illegaler Einsatz von Clenbuterol in der Kälber- und Schweinemast wurde bei Kontrollen aufgedeckt (Fürst et al., 1989b; Edelhäuser & Scherbaum, 1991)

1989

Deutschland:- illegaler Einsatz von Salbutamol in der Kälbermast: in 78 von 570 untersuchten Proben aus 26 von 100 Mastbeständen wurden Konzentrationen im Bereich 0,5-2400 $\mu\text{g/l}$ gefunden (Fürst et al., 1989a; Edelhäuser & Scherbaum, 1991)

Spanien: - 735 Menschen mit Lebensmittelintoxikation nach Verzehr von clenbuterolhaltigem Fleisch (Animal Pharm, 1997)

1990

Spanien: - 125 Menschen mit Lebensmittelintoxikation nach Verzehr von clenbuterolhaltigen Rinderlebern

➔ Symptome: Muskelschmerzen, -tremor, Herzklopfen, Tachykardie, Nervosität (Die Symptome traten 30 Minuten - 6 Stunden nach Verzehr auf und hielten über 8-96 Stunden an.)

➔ Konzentrationen in der Leber: zwischen 160-291 $\mu\text{g/kg}$

➔ Konzentrationen im Urin von zwei Patienten 48 Stunden nach dem Verzehr: 2 und 4 $\mu\text{g/kg}$ (WHO-Newsletter, 1991; Martinez-Navarro, 1990)

Frankreich: - 22 Menschen mit Lebensmittelintoxikation nach Verzehr von clenbuterolhaltigen Kalbslebern

➔ Symptome: Schwindelgefühl, Tachykardie, Übelkeit, Nervosität, Muskelschmerzen, Kopfschmerzen (Die Symptome traten 1-3 Stunden nach Verzehr auf und hielten über 1-3 Tage an.)

➔ Konzentrationen in der Leber: zwischen 375-500 $\mu\text{g/kg}$ (Pulce et al., 1991; WHO-Newsletter, 1991)

1991

Spanien: - 15 Menschen mit Lebensmittelintoxikation nach Verzehr von Leber und Fleisch, welches mit Clenbuterol belastet war (WHO Newsletter, 1992)

1992

- Spanien: - 204 Menschen mit Lebensmittelintoxikation nach Verzehr von Rinderleber und Rinderfleisch, welches mit Clenbuterol belastet war (WHO Newsletter, 1992)

1993

- Frankreich: - 60 Farmer mit einer Produktion von 12.000 Kälbern waren an einem Clenbuterolskandal beteiligt, 4 Personen wurden festgenommen (Animal Pharm, 1993d)
- Holland: - illegale Clenbuterolbehandlungen wurden bei Schafen festgestellt, insgesamt konnten 5.000 Flaschen mit Clenbuterol sichergestellt werden (Animal Pharm, 1993c)

1994

- Spanien: - 155 Menschen mit Lebensmittelintoxikation nach Verzehr von clenbuterolhaltigem Fleisch, 25 Personen wurden festgenommen und 80 kg Clenbuterol beschlagnahmt (Animal Pharm, 1994)

1995

- Italien: - 16 Menschen mit Lebensmittelintoxikation nach Verzehr von clenbuterolhaltigem Rindfleisch
- ➔ Symptome: Tachykardie, Nervosität, Muskeltremor (Die Symptome traten 3 Stunden nach Verzehr auf und hielten über 10 Stunden an.)
 - ➔ Konzentrationen im Fleisch: lagen bei 500 µg/kg,
 - ➔ die Behandlung mit einem β -Blocker konnten die Symptome beseitigen (Maistro et al., 1995)

1996

- Deutschland:- illegaler Einsatz von Brombuterol, wobei bis zu 0,7 ng/ml Urin nachgewiesen wurden (AgE, 1996; Der Kassenarzt, 1997) und
- illegaler Einsatz von Clenbuterol in der Kälbermast, wobei in 8 von 53 kontrollierten Beständen der Clenbuterolmissbrauch nachgewiesen wurde (Die TAZ und Die Welt, 1996)

1997

- Irland: - 8 Farmer wurden wegen illegalen Einsatzes von Clenbuterol verurteilt, 1 Händler war maßgeblich an der Produktion und am Vertrieb von 4 t Clenbuterol beteiligt (AgE, 1997)

1997

Italien: - Lebensmittelintoxikation in einer Schule nach Verzehr von clenbuterolhaltigem Rindfleisch, 16 Schüler wurden ins Krankenhaus eingeliefert, Clenbuterol wurde sowohl im Fleisch als auch im Urin der Patienten nachgewiesen (Delltaia, 1997)

1998

Deutschland:- illegaler Einsatz von Clenbuterol in einem Kälbermastbetrieb mit insgesamt 791 Kälbern; bei 65 der 127 beprobten Kälber wurde Clenbuterol nachgewiesen; der Bestand wurde gesperrt (dpa-Meldung, 1998)

Clenbuterol wird aber nicht nur in Europa missbräuchlich eingesetzt. So ist aus den USA ein Fall dokumentiert, wo zwei Händler wegen illegaler Einfuhr und illegalen Vertriebs unerlaubter Tierarzneimittel, einschließlich Clenbuterol, die zur Verwendung für Kälber bestimmt waren und zum Teil bereits eingesetzt worden sind, zu einer Gefängnisstrafe von 44 Monaten bzw. zu einer Geldstrafe von 350.000 US\$ und zur Schadensregulierung verurteilt wurden (CVM UPDATE, 1997).

2.8 RÜCKSTANDSVERHALTEN VON CLENBUTEROL

Bei jedem neuen pharmakologisch wirksamen Stoff sind Erkenntnisse über dessen Verteilung und Rückstandsverhalten im Organismus besonders wichtig. Daher führten Kopitar & Zimmer bereits 1976 diesbezügliche Untersuchungen beim Menschen sowie bei Ratten, Hunden und Kaninchen durch. Die Verteilung von ¹⁴C-Clenbuterol im Körper von Ratten wurde zu verschiedenen Zeiten nach einer intravenösen bzw. oraler Applikation mittels Ganztierautoradiogramm geprüft. Nach oraler Applikation war die maximale Verteilung im Organismus nach 3 Stunden erreicht. Zu diesem Zeitpunkt wurden die höchsten Radioaktivitäten in folgenden Geweben gemessen (hier in abnehmender Reihenfolge ihres Gehaltes dargestellt): Magen > Dünndarm > Leber > Urin > Nieren > Blut > Dickdarm > Lunge. Clenbuterol passierte die Hirnschranke und die Plazentaschranke (Kopitar & Zimmer, 1976a und b). Rinke & Meyer (1991) ermittelten ebenfalls Clenbuterolgehalte in den verschiedensten Organen und Geweben von Kälbern, die mit einer Clenbuteroldosis von täglich 2 x 5 µg/kg KG über 3 Wochen behandelt wurden. Die wichtigsten Organe und Gewebe sind in abnehmender Reihenfolge ihres Gehaltes am letzten Behandlungstag im Folgenden dargestellt: Auge > Lunge > Leber > Nieren > Milz > Thymus > Ovarien > Herz > Dickdarm > Magen > Uterus > Muskel > Fett. 14 Tage post applicationem war Clenbuterol lediglich noch in Auge > Leber > Fett messbar.

Zur Überprüfung der Clenbuteroleinsatzes in der Tierproduktion sind vor allem Ergebnisse über das Rückstandsverhalten nach Verabreichung von therapeutischen Dosen bzw. von illegalen Dosierungen zur Verbesserung des Mastfolges von Interesse. Verschiedene Studien befassten sich daher auch mit den Clenbuterolgehalten in verschiedenen Organen und Körperflüssigkeiten während und nach einer Clenbuterolbehandlung.

2.8.1 Clenbuterolkonzentrationen während einer Behandlung

Organe

Die Clenbuterolkonzentrationen in Leber und Augen bzw. Retina von Färsen ermittelten Elliott et al. (1993a und 1995) während der oralen Verabreichung einer Mastdosis von 16 µg/kg/Tag über 30 Tage bzw. einer therapeutischen Dosis von 1,6 µg/kg/Tag über 7 Tage. Die Mittelwerte von 2 Tieren je Behandlungstag gibt die Tabelle 7 wieder. Aufgrund der geringen Tierzahlen ist allerdings eine Interpretation der Ergebnisse kaum möglich. Clenbuterol scheint sich in beiden Organen anzureichern, wobei aber nach 30 Tagen geringere Gehalte gemessen wurden als nach 15 Tagen.

Tabelle 7 Clenbuterolgehalte [ng/g] an verschiedenen Tagen während der Behandlungen

Behandlungs- tag	therapeutischen Dosis		Mastdosis	
	Leber	Auge	Leber	Retina
1	9,3	69,4	29,3	291
4	9,3	173,1	-	-
7	20,4	461,3	73,8	1216
15	-	-	227,2	2122
30	-	-	61,7	1700

Plasma

Rinke (1990) untersuchte Plasma von 5 Kälbern, denen 2 x täglich 5 µg Clenbuterol pro kg KG über 21 Tage verabreicht wurden, am 1., 3. und 21. Behandlungstag. An jedem der 3 Behandlungstage stieg die Clenbuterolkonzentration nach ca. 20 Minuten - 1 Stunde an, erreichte nach 1,5-2 Stunden ein Plateau und fiel nach 6-7 Stunden wieder ab. Die Plateaukonzentrationen lagen an den verschiedenen Behandlungstagen im Mittel bei 0,5 ng Clenbuterol pro ml Plasma (1. Tag), 0,7 ng/ml (3. Tag) und 1,1 ng/ml (21. Tag).

Dave et al. (1998) erreichten während einer Behandlung von 20 Kälbern mit täglich 2 x 0,8 µg Clenbuterol pro kg KG über 10 Tage Maximalkonzentrationen von 0,4 ng/ml (SD 0,2 ng/ml)

und während einer Behandlung von 8 Kälbern mit täglich 2 x 10 µg/kg KG über 21 Tage Maximalkonzentrationen von 15,3 ng/ml (SD 5,4 ng/ml).

Gleixner & Meyer (1995) behandelten 6 Kälber mit einer therapeutischen Dosis von 2 x 0,8 µg/kg über 10 Tage und ermittelten während des Behandlungszeitraums (2.-10. Tag) bei Probenahmen 5 Stunden nach Dosisgabe Clenbuterolgehalte im Plasma, die zwischen 0,136 und 0,467 ng/ml und im Mittel bei 0,283 ng/ml (SD 0,086 ng/ml) lagen.

Urin

Rinke (1990) untersuchte den Urin von 7 Kälbern während einer täglichen Behandlung mit 2 x 5 µg Clenbuterol pro kg KG über 21 Tage. Maximalwerte wurden bereits einen halben Tag nach Applikationsbeginn festgestellt. Proben wurden täglich entnommen, wobei die Werte zwischen 1 und 193 ng/ml und im Mittel bei 47 ng/ml Urin (SD 37 ng/ml und ME 44 ng/ml) lagen. Es konnten keine von den Entnahmetagen abhängigen Konzentrationsunterschiede festgestellt werden. In der gleichen Arbeit wurden bei 4 Kälbern nach einer Dosis von täglich 2 x 0,8 µg Clenbuterol pro kg KG über 10 Tage Clenbuterolgehalte im Urin zwischen 0,6 und 24,4 ng/ml und im Mittel 5,3 ng/ml (SD 7,4 ng/ml und ME 1,8 ng/ml) festgestellt. Die mittleren Urinkonzentrationen waren damit bei der hohen Dosis ca. neunmal höher als bei der therapeutischen Dosis.

2.8.2 Clenbuterolkonzentrationen nach einer Behandlung

Organe und Gewebe

Die aus verschiedenen Studien zusammengefassten Clenbuterolgehalte, welche in Organen und Geweben von Kälbern und Färsen zu unterschiedlichen Zeiten nach der letzten Dosis ermittelt wurden, sind in Tabelle 8 dargestellt. Die Studien belegen übereinstimmend, dass die höchsten Clenbuterolkonzentrationen in Augen bzw. in der Retina und in Haaren gemessen wurden, gefolgt von Leber und Niere. Im Muskel und im Fett wurden dagegen wesentlich geringere Gehalte ermittelt. Am längsten ist Clenbuterol ebenfalls in Augen bzw. in der Retina und in Haaren nachzuweisen. In Leber und Niere ist es ähnlich lange auffindbar. Im Fett konnte es dagegen durch die verschiedenen Autoren unterschiedlich lange nachgewiesen werden.

Tabelle 8, Seite 1 Rückstände von Clenbuterol (Cl.) in verschiedenen Geweben nach unterschiedlichen Dosisgaben [MW / SD ng/g bzw. MW ng/g]

Dosis und Applikationsform	Anzahl Tiere	Wartezeit [Tage]	Muskel	Leber	Niere	Auge bzw. Retina	Haare	Fett	Autor
2 x 0,8 µg ¹⁴ C-Cl. pro kg KG/Tag über 11 Tage: davon 4 Tage i.m. und 7 Tage oral (preruminante Kälber)	3	1	0,86 / 0,39	9,2 / 3,33	9,1 / 3,74	-	-	0,96 / 0,58	Heitzman (1996)
	3	7	NN	1,4 / 0,19	0,41 / 0,02	-	-	NN	
	3	10	NN	0,85 / 0,10	0,27 / 0,07	-	-	NN	
2 x 0,8 µg ¹⁴ C-Cl. pro kg KG/Tag; i.m. über 21 Tage (ruminante Kälber)	3	0,25	2,2 / 0,27	36,6 / 9,5	38,7 / 8,4	-	-	0,82 / 0,42	Heitzman (1996)
	3	6	0,09 / 0,10	7,4 / 2,2	3,2 / 0,5	-	-	NN	
	3	10	NN	4,3 / 0,5	2,2 / 0,6	-	-	NN	
2 x 0,8 µg ¹⁴ C-Cl. pro kg KG/Tag; i.m. über 10,5 Tage (ruminante Kälber)	4	0,25	0,79 / 0,20	20,7 / 4,8	16,1 / 2,3	-	-	0,55 / 0,1	Heitzman (1996)
	4	5	0,16 / 0,03	3,9 / 0,7	2,2 / 0,5	-	-	0,12 / 0,2	
	4	28	NN	0,89 / 0,1	0,46 / 0,2	-	-	NN	
2 x 0,8 µg/kg/Tag oral über 4 Tage (ruminante Färsen)	4	7	-	0,31 / 0,038	-	12,6 / 1,0	-	-	Sauer et al. (1993)
1,6 µg/kg/Tag; oral über 7 Tage (ruminante Färsen)	2	14	< 0,2	< 0,2	< 0,2	27,1	-	-	Elliott et al. (1995)
	2	28	< 0,2	< 0,2	< 0,2	6,0	-	-	
	2	42	< 0,2	< 0,2	< 0,2	6,2	-	-	
2 x 0,8 µg/kg KG/Tag; oral über 10 Tage (preruminante Kälber)	2	0	0,41	6,4	2,71	3,9	-	-	Rinke (1990)
	2	3,5	< 0,1	0,45	0,21	2,0	-	-	
2 µg/kg KG/Tag; oral über 11 bzw. 15 Tage (preruminante Kälber)	1	3	< 0,3	0,8	< 0,3	-	-	-	Degand et al. (1992)
	1	4	< 0,3	< 0,3	< 0,3	-	-	-	
	1	7	< 0,3	< 0,3	< 0,3	-	-	-	
2 x 5 µg/kg KG/Tag; oral über 21 Tage (preruminante Kälber)	3	0	5,7	39	33	118	-	4,4	Meyer & Rinke (1991)
	3	3,5	0,2	1,6	1,2	58	-	0,35	
	3	14	< 0,08	0,58	< 0,08	15,1	-	0,22	
2 x 5 µg/kg KG/Tag; oral über 21 Tage (ruminante Kälber)	1	0	21,8	93,5	79,8	454	516	-	Appelgren et al. (1996)
	1	7	0,63	1,2	0,78	207	736	-	
	1	14	0,63	< 0,5	0,52	220	1133	-	
	1	28	-	-	-	670	245	-	
	1	56	-	-	-	214	212	-	
	1	126	-	-	-	25,4	14	-	
16 µg/kg/Tag oral über 30 Tage (ruminante Färsen)	2	15	-	1,9	-	150	-	-	Elliott et al. (1993a)
	2	35	-	0,6	-	30	-	-	
	2	56	-	0,35	-	54	-	-	
	2	84	-	< 0,2	-	42	-	-	
	2	112	-	< 0,2	-	22,5	-	-	
	2	140	-	< 0,2	-	22,5	-	-	
2 x 10 µg/kg KG/Tag; oral über 21 Tage (ruminante Kälber)	4	0,25	-	185 / 40,5	190*	1946 / 154	-	-	Sauer & Limer (1993); Sauer et al. (1995); Quirke (1994a)
	4	1	-	140 / 64,4	210*	1826 / 794	-	-	
	4	2	-	100 / 23,1	70*	1485 / 160	-	-	
	4	4	-	41 / 15,3	30*	1018 / 201	-	-	
	4	8	-	21 / 3,0	9-10*	530 / 253	-	-	
	4	16	-	9,7 / 1,39	4-5*	519 / 205	-	-	
									* Ergebnisse aus dem Diagramm entnommen
1,6 µg/kg/Tag; oral	3	0	0,66	20,2	16,4	-	-	-	Elliott et

Tabelle 8, Seite 2 Rückstände von Clenbuterol (Cl.) in verschiedenen Geweben**nach unterschiedlichen Dosisgaben
[MW und SD ng/g bzw. MW ng/g]**

Dosis und Applikationsform	Anzahl Tiere	Wartezeit [Tage]	Muskel	Leber	Niere	Auge bzw. Retina	Autor
1,6 µg/kg/Tag; oral über 14 Tage (ruminante Lämmer)	3	0	0,66	20,2	16,4	-	Elliott et al. (1993b)
	3	5	0	2,1	1,2	-	
	3	10	0	0,66	0,05	-	
	3	15	0	0,59	0,1	-	
16 µg/kg/Tag; oral über 14 Tage (ruminante Lämmer)	3	0	8,9	162,0	83,9	-	Elliott et al. (1993b)
	3	5	0,31	24,6	2,8	-	
	3	10	0,03	4,9	0,40	-	
	3	15	0,04	3,2	0,42	-	
40 µg/kg/Tag; oral über 14 Tage (ruminante Lämmer)	3	0	15,7	302,4	267,2	-	Elliott et al. (1993b)
	3	5	0,41	51,4	4,8	-	
	3	10	0,07	14,8	0,50	-	
	3	15	0,06	3,6	1,0	-	

Plasma

Rinke (1990) konnte bei 5 Kälbern, die 2 x täglich 5 µg/kg KG über 21 Tage erhielten, Clenbuterol bis zur letzten Probenahme 120 Stunden nach der letzten Dosis nachweisen.

Dave et al. (1998) konnten Clenbuterol im Plasma vereinzelt noch 336 Stunden nach der letzten therapeutischen Dosis (2 x 0,8 µg/kg KG über 10 Tage) und 384 Stunden nach der letzten Dosis von 2 x 10 µg/kg KG über 21 Tage nachweisen (Werte aus der graphischen Darstellung entnommen).

Gleixner & Meyer (1995) behandelten 6 Kälber mit einer therapeutischen Dosis von 2 x 0,8 µg/kg über 10 Tage und konnten 2 Tage nach der letzten Dosis noch Gehalte zwischen 0,03 und 0,232 ng/ml messen. Bei einem Tier konnte Clenbuterol noch nach 8 Tagen nachgewiesen werden.

Urin

Rinke (1990) untersuchte den Urin von 7 Kälbern nach der letzten Applikation einer Dosis von täglich 2 x 5 µg Clenbuterol pro kg KG über 21 Tage und wies Clenbuterol bis zum letzten Entnahmetag der Entzugsphase (13. Tag) nach.

Auge

Von einigen β-Agonisten ist bekannt, dass sie in den pigmentierten Geweben des Körpers akkumulieren. Sauer & Anderson (1994) konnten eine deutliche Bindung von Clenbuterol und Salmeterol aber nicht von Salbutamol an Melanin bei Versuchen in vitro feststellen. Dürsch et

al. (1995) stellten höhere Clenbuterolgehalte in Augen von pigmentierten Ratten als in solchen von unpigmentierten Ratten fest. Dürsch (1992) wies nach Perfusionsversuchen in vitro eine Akkumulation von Clenbuterol, Mabuterol, Salbutamol, Terbutalin und 2-Amino-3-Chlor 5 (1'-Hydroxy 2'-amino-tert.-butyl-ethyl) Pyridin in Retina/Uvea nach, wobei der Grad der Akkumulation unterschiedlich stark war. Bei Clenbuterol und Mabuterol wurden im Gegensatz zu den anderen β -Agonisten fünffach höhere Clenbuterolkonzentrationen gemessen. Nach oraler Applikation von 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Salbutamol konnte Dürsch (1992) 3,9 ng/g und im Spot-on Versuch mit 200 mg Terbutalin 0,9 ng/g im Augenninneren messen. Rinke (1990) ermittelte dagegen mit 118 ng/g wesentlich höhere Werte nach Applikation von 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Clenbuterol.

Sauer & Limer (1993) und Sauer et al. (1995) berichteten über die Untersuchung verschiedener Teile der Augen von Kälbern, die mit einer oralen Dosis von 2 x täglich 10 μg Clenbuterol pro kg KG über 21 Tage behandelt wurden. Die Clenbuterolkonzentration der einzelnen Teile nahm in folgender Reihenfolge ab: Choroidea (mit pigmentiertem Retinaepithel) > Cornea > Sclera > Retina (ohne pigmentiertes Retinaepithel) > Glaskörper \geq Linse (Sauer et al., 1995). Sauer et al. (1995) ermittelten bei diesen Geweben Anfangskonzentrationen, 6 Stunden nach der letzten Dosis, von:

- Choroidea (mit pigmentiertem Retinaepithel): 1946 ng/g (SD 154) ng/g
- Cornea: 500-600 ng/g*
- Sclera: 280-360 ng/g*
- Retina (ohne pigmentiertes Retinaepithel): 200 ng/g*
- Glaskörper: 2-10 ng/g*
- Linse: 2-6 ng/g*

*Diese Werte wurden aus Diagrammen entnommen.

Die Abnahme der Clenbuterolkonzentration nach der letzten Dosis aus der Choroidea (mit pigmentiertem Retinaepithel) ist in Tabelle 8 dargestellt (Sauer & Limer, 1993). Diese wurden bereits vor dem Einfrieren präpariert. Bei Augen, die im Ganzen eingefroren und bei denen die Choroidea (mit pigmentiertem Retinaepithel) erst nach dem Einfrieren präpariert wurde, konnten Sauer & Limer (1993) nur noch Clenbuterolgehalte messen, die bei 50 % (33-64 %) der in Tabelle 8 genannten Ausgangskonzentrationen lagen.

Sauer & Anderson (1994) behandelten 3 Monate alte Kälber 21 Tage über ein Implantat mit einer Dosis von 1,5 mg/Tag (ca. 14 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{Tag}$) und ermittelten in der Choroidea (mit pigmentiertem Retinaepithel) Clenbuterolgehalte im Mittel von 1779 ng/g nach 0 Tagen und relativ gleichbleibende Gehalte von ca. 512 ng/g zwischen dem 16 und 64 nach der letzten Dosis.

Im pigmentierten Epithel ist nicht nur die Anfangskonzentration von Clenbuterol gegenüber anderen Organen wesentlich höher, Clenbuterol ist auch wesentlich länger und in höherer Konzentration nachzuweisen. Dies wird deutlich, wenn man das Konzentrationsverhältnis zwischen Choroidea (mit pigmentiertem Retinaepithel) und Leber zu verschiedenen Zeiten nach der letzten Behandlung betrachtet. Nach 6 Stunden und 1, 2, 4, 8, und 16 Tagen änderte sich dieses Verhältnis wie folgt: 11:1, 13:1, 15:1, 25:1, 52:1 (Sauer et al., 1995). Appelgren et al. (1996) wiesen Clenbuterol in Augen über 18 Wochen nach (s. Tabelle 8).

Unterschiede zwischen den Clenbuterolgehalten des rechten und des linken Auges konnten Gleixner & Meyer (1995) nicht feststellen.

Haar

Wie bereits beim Auge ausgeführt, akkumuliert Clenbuterol bevorzugt in den pigmentierten Gewebeteilen. So konnte in dunklen Haaren (Schwarz bzw. Braun) 20-100mal mehr Clenbuterol nachgewiesen werden als in weißem Haar (Dürsch et al., 1995; Godfrey et al., 1996; Gleixner et al., 1996). Gleixner et al. (1996) stellten in gelb/rotem und grau/cremefarbenen Haar ähnliche Gehalte wie in weißem Haar und in schwarzem Haar noch 2-4mal höhere Werte als in dunkelgrauem Haar fest.

Sauer & Anderson (1994), die Kälber 21 Tage mit einer Dosis von 1,5 mg/Tag behandelten, ermittelten zwischen 0 und 64 Tagen nach der letzten Dosis in den Haaren relativ gleichbleibende Clenbuterolgehalte im Durchschnitt von ca. 450 ng/g.

Appelgren et al. (1996) wiesen Clenbuterol in pigmentierten Haaren im Anschluss an die letzte Behandlung noch über 18 Wochen nach. Bei vorher geschorenen Partien wurden zwar 2-5mal so hohe Konzentrationen gefunden, aber nur im ungeschorenen Bereich war Clenbuterol nach 18 Wochen noch nachweisbar (jeweilige Werte s. Tabelle 8). Ähnliches bestätigten auch Untersuchungen von Gleixner et al. (1996).

Haare sind als Matrix für die Rückstandsüberwachung von besonderem Interesse, da Clenbuterol lange Zeit in hohen Konzentrationen nachgewiesen werden kann und die Probenahme einfach durchzuführen ist. Schwierig ist dagegen die Unterscheidung, ob es sich bei einem positivem Clenbuterolnachweis um eine Kontamination des Haares von außen oder um eine Clenbuterolbehandlung des Tieres handelt. Elliott et al. (1996) unterzogen daher Haare von Rindern, die mit Clenbuterol gespickt wurden, verschiedenen Waschprozessen. Die besten Resultate wurden mit einer sauren und einer sich anschließenden alkalischen Waschprozedur erzielt. Clenbuterol ließ sich aus den Haaren von oral behandelten Tieren nur zu ca. 2 % auswaschen. Aus Haaren von Tieren, die äußerlich mit Clenbuterol kontaminiert

wurden, ließ sich Clenbuterol nur innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Kontamination zu ca. 60 % auswaschen. Einen Monat nach der Kontamination war Clenbuterol soweit fixiert, dass es nur noch zu unter 10 % löslich war. Zu ähnlichen Resultaten kamen auch Hahnau & Jülicher (1997). Durch den Waschprozess war eine restlose Entfernung des nach äußerlicher Kontamination am Haar haftenden Clenbuterols nicht möglich. Da zwischen behandelten und kontaminierten Tieren nicht differenziert werden kann, kommen Hahnau & Jülicher zu dem Schluss, dass die Verwendung von Haaren als alleinige Matrix zum Nachweis eines Clenbuterolmissbrauchs nicht ausreichend ist.

2.9 PHARMAKOKINETIK

2.9.1 Vorbemerkungen

Der Begriff „Pharmakokinetik“ wurde erstmals von Dost in seinem im Jahre 1953 erschienenen Buch „Der Blutspiegel, Kinetik der Konzentrationsabläufe in der Kreislaufflüssigkeit“ verwendet. Definiert wurde der Begriff als Lehre von der quantitativen Auseinandersetzung zwischen Organismus und appliziertem Pharmakon. Im Mittelpunkt der Untersuchungen steht die mathematische Beschreibung der in einem zeitlichen Verlauf ermittelten Konzentrationen eines Arzneistoffs und seiner Metaboliten im Organismus. Zielsetzung von pharmakokinetischen Studien ist es, die optimale Anwendungsform für einen Arzneistoff beim Patienten zu finden. Getestet werden dabei unter anderem Applikationsform, Dosis und Dosierschema. Bereits seit Anfang der zwanziger Jahre wurden Methoden zur Analyse von Konzentrations-Zeit-Kurven entwickelt, um die Wirkung des Organismus auf ein Pharmakon darzustellen. Widmark & Tandberg (1924) führten Untersuchungen über die Elimination von indifferenten Narkotika durch und formulierten erstmals die Gleichung für das Ein-Kompartiment-Modell. Um den Weg eines pharmakologischen Stoffes im Organismus verfolgen zu können, werden vorrangig leicht zu gewinnende Körperflüssigkeiten wie Blut, Urin und Speichel zur Probenahme ausgewählt und der Konzentrations-Zeit-Verlauf des Stoffes bestimmt. Diesem Verlauf wird ein Modell angepasst, das anschließend die Berechnung pharmakokinetischer Parameter erlaubt.

2.9.2 Pharmakokinetische Grundbegriffe und Modelle

Um den Weg, den ein Stoff im Körper durchläuft, mathematisch beschreiben zu können, müssen verschiedene Prozesse betrachtet werden. Diese werden auch als „LADME“-Prinzip bezeichnet. Nachdem ein Arzneistoff verabreicht wurde, durchlaufen feste Arzneiformen die Phase **L**iberation, in der es entweder durch Zerfall oder Auflösung zur Freisetzung des eigentlichen pharmakologischen Wirkstoffes kommt. Die sich anschließende **A**bsorption

(Resorption), die in den meisten Fällen durch passive Diffusion erfolgt, setzt eine minimale Löslichkeit des Stoffes in Wasser sowie Membrangängigkeit voraus. Ungelöste größere Teilchen können nicht diffundieren. Die **Distribution** (Verteilung) des Arzneistoffes im gesamten Körper erfolgt über den Blutkreislauf, wodurch auch der eigentlich erwünschte Wirkungsort erreicht wird. Die **Elimination** umfasst alle Prozesse, die zur Abnahme des Stoffes im Körper führen. Dazu gehören sowohl die Vorgänge der Biotransformation (**Metabolismus**) als auch der **Exkretion** (Ausscheidung).

Für die Beschreibung der Verteilung eines Stoffes im Körper wurden verschiedene methodische Ansätze entwickelt. Am häufigsten wird der Körper als ein System von kinetischen Kompartimenten oder Verteilungsräumen gesehen. Dieser Ansatz wurde auch in der vorliegenden Arbeit für die Interpretation des zeitlichen Verlaufes der Konzentration von Clenbuterol im Blutplasma nach Einmaldosierung gewählt und soll daher kurz erläutert werden. Die zur Ermittlung der pharmakologischen Parameter verwendeten Gleichungen sind im Teil „Material und Methodik“ unter 3.4.4 dargestellt:

Das einfachste pharmakokinetische Modell ist das **Ein-Kompartiment-Modell**. Bei diesem Modell wird der Organismus als ein System betrachtet, in dem sich der Arzneistoff sofort nach der Applikation gleichmäßig verteilt, bis sich alle Körperflüssigkeiten im Fließgleichgewicht befinden. Bei lebenden Organismen spricht man von einem offenen System, da der verabreichte Stoff den Verteilungsraum wieder verlässt, d.h. er wird in Metaboliten umgewandelt bzw. direkt ausgeschieden. Als Beispiel ist in Abbildung 2 die Resorption, Verteilung und Elimination eines Arzneistoffs nach oraler Applikation in einem Ein-Kompartiment-Modell dargestellt.

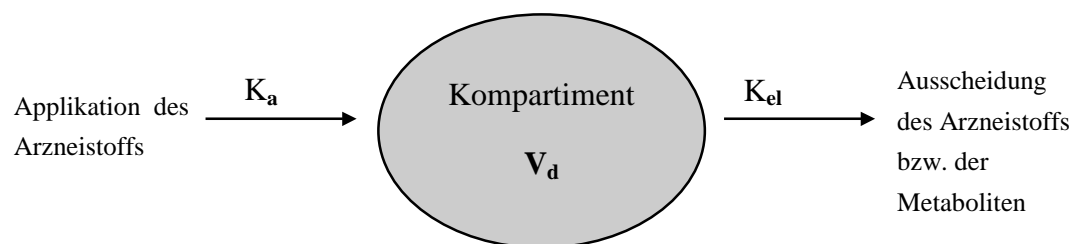


Abbildung 2 Schematische Darstellung des Ein-Kompartiment-Modells nach extravasaler Applikation

K_a	Absorptionsgeschwindigkeitskonstante
V_d	Verteilungsvolumen
K_{el}	Eliminationsgeschwindigkeitskonstante

Im Unterschied zum Ein-Kompartiment-Modell erreicht beim **Zwei-Kompartiment-Modell** der Arzneistoff mit der Kreislaufflüssigkeit nicht nur die leicht zugänglichen Gewebe sondern, zeitlich verzögert, auch schwer zugängliche Bereiche. Als zentrales oder erstes Kompartiment werden die innerhalb der ersten Minuten zu erreichenden Kreislaufflüssigkeiten und Gewebe

bezeichnet. Das periphere oder zweite Kompartiment umfasst die Gewebe und Organe, die erst nach zeitlicher Verzögerung erreicht werden. Abbildung 3 verdeutlicht die Verteilungs- und Eliminationsvorgänge in einem Zwei-Kompartiment-Modell nach einer intravenösen Injektion. Resorptionsvorgänge entfallen bei diesem Modell.

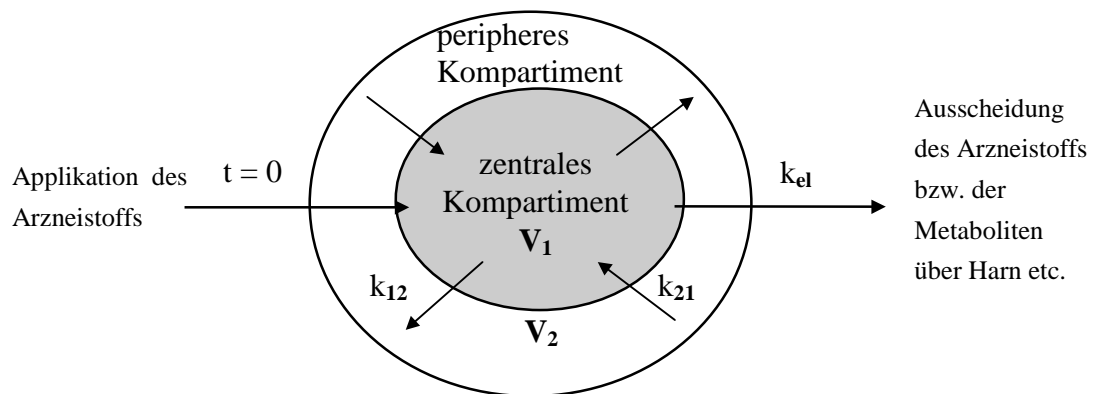


Abbildung 3 Schematische Darstellung des Zwei-Kompartiment-Modells nach intravenöser Injektion

V_1, V_2	Verteilungsvolumina der einzelnen Kompartimente
k_{21}, k_{12}	Transferkonstanten zwischen den Kompartimenten
k_{el}	Eliminationsgeschwindigkeitskonstante aus dem zentralen Kompartiment

In den meisten Fällen wird die Wahl für eines dieser Modelle anhand der Plasmaspiegelkurve getroffen, die in ein halblogarithmisches Koordinatensystem eingezeichnet wird. Als Beispiel für ein Ein-Kompartiment-Modell ist in Abbildung 4 der Plasmaspiegelverlauf nach einmaliger extravasaler Applikation von $10 \mu\text{g}$ Clenbuterol pro kg KG mit den Mittelwerten von 5 Tieren (Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit) dargestellt.

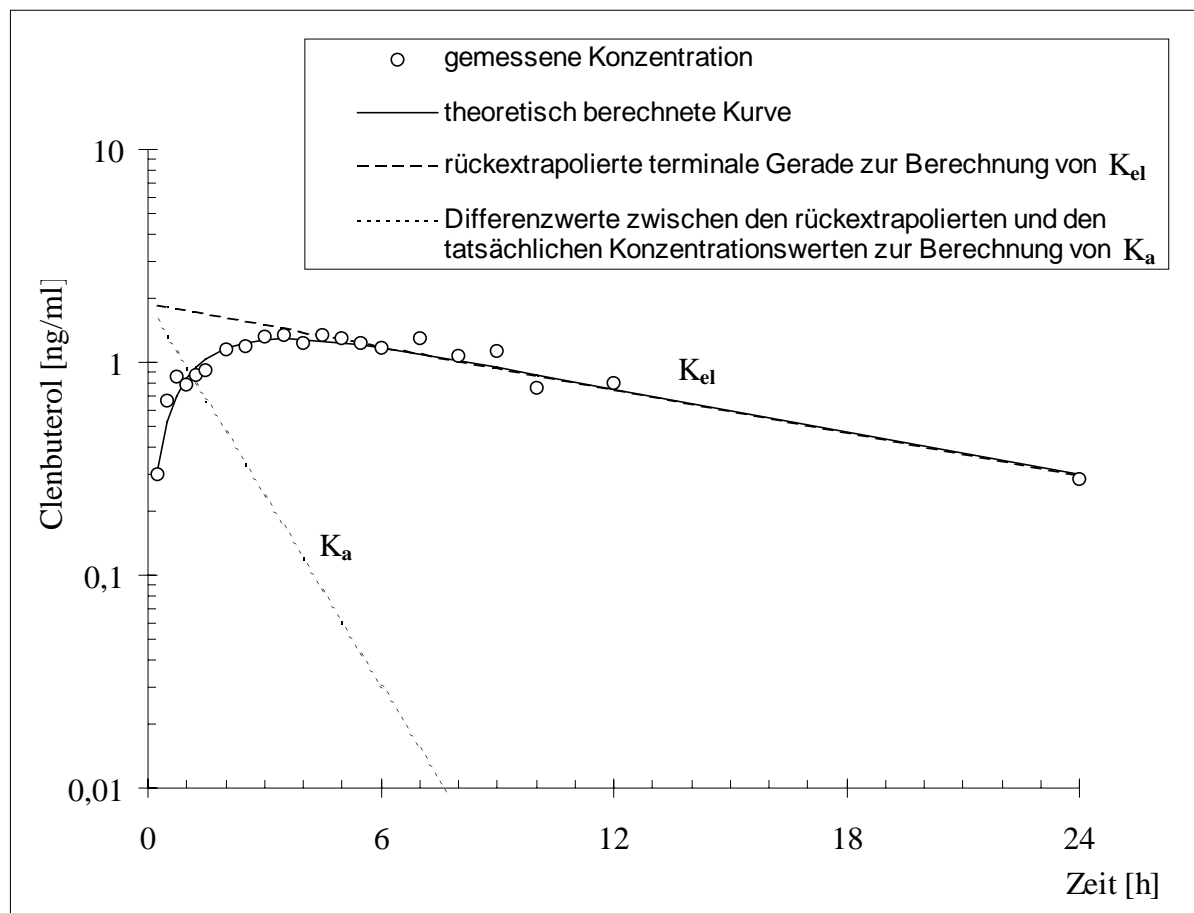


Abbildung 4 halblogarithmische Darstellung des Plasmaspiegelverlaufs in einem Ein-Kompartiment-Modell nach extravasaler Applikation von $10 \mu\text{g}$ Clenbuterol pro kg KG (Mittelwerte von 5 Tieren)
 K_a , K_{el} Geschwindigkeitskonstanten für Absorption und Elimination

In einem Zwei-Kompartiment-Modell verläuft die Plasmaspiegelkurve wie in Abbildung 5 dargestellt. Als Beispiel dienen eigene Untersuchungsergebnisse (Mittelwerte von 6 Tieren, denen einmalig $3 \mu\text{g}$ Clenbuterol pro kg KG intravenös verabreicht wurde).

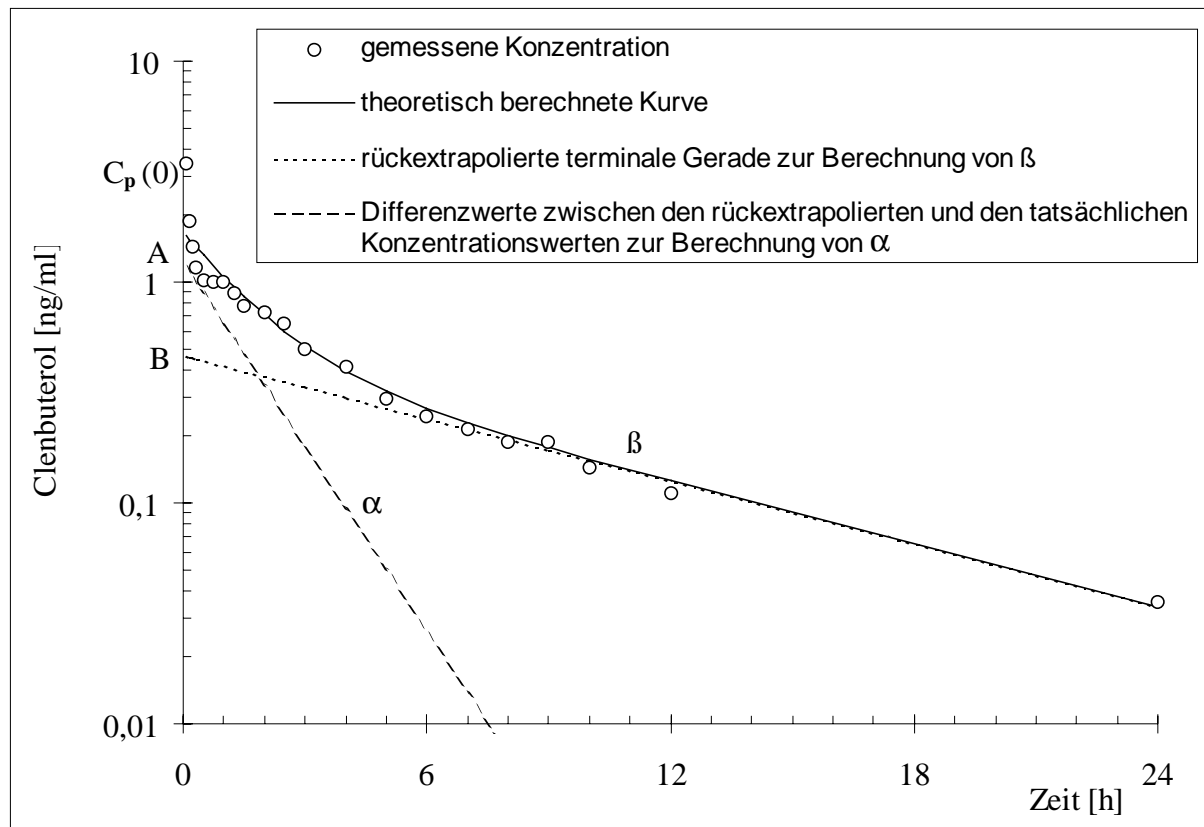


Abbildung 5 halblogarithmische Darstellung des Plasmaspiegelverlaufs in einem Zwei-Kompartiment-Modell nach intravenöser Applikation von 3 μg Clenbuterol pro kg KG (Mittelwerte von 6 Tieren)
 α , β Geschwindigkeitskonstanten für Verteilung und Elimination
 A, B Ordinaten Schnittpunkte zur Berechnung der Anfangskonzentration $C_p(0)$

Das **Verteilungsvolumen** ist ein Parameter für die im Organismus vorhandene Arzneistoffmenge, die sich proportional zur Plasmakonzentration verhält. Es dient beispielsweise der Berechnung der einzusetzenden Dosis, die notwendig ist, um einen bestimmten Gewebespiegel zu erhalten.

Während sich ein Stoff im Ein-Kompartiment-Modell nur in einem Verteilungsvolumen (V_d) ausbreitet, ändert sich das Verteilungsvolumen im Zwei-Kompartiment-Modell durch die zeitliche Verzögerung, mit der sich ein Stoff verteilt. Nach intravenöser Applikation verhält sich daher das Verteilungsvolumen zwischen dem zentralen Kompartiment (V_1) und dem peripheren Kompartiment (V_2) als Funktion der Zeit, bis sich ein Gleichgewicht zwischen den beiden Kompartimenten (V_{dss}) eingestellt hat.

Um interindividuelle Streuungen zu vermeiden und so die ermittelten Werte für das Verteilungsvolumen auch auf andere Tiere derselben Spezies übertragen zu können, wird der **Distributionskoeffizient** (Δ') ermittelt.

Die **Clearance** dient als Maß für die Fähigkeit des Organismus, ein Pharmakon zu eliminieren. Mit ihr wird das Volumen einer Körperflüssigkeit (z.B. Plasma) erfasst, das pro Zeiteinheit von einer Substanz befreit wird (Pfeifer et al., 1995), wobei sowohl die Vorgänge der Exkretion als auch der Biotransformation berücksichtigt werden. Bei den meisten Pharmaka ist die Eliminationsgeschwindigkeit proportional zur Plasmakonzentration. Daher wird die Clearance auch als Proportionalitätsfaktor zwischen der pro Zeiteinheit ausgeschiedenen Menge eines Pharmakons und der Plasmakonzentration bezeichnet (Fichtl, 1995). Die totale Clearance (Cl_{tot}) oder auch Gesamtkörperclearance umfasst sämtliche Eliminationsmöglichkeiten aus dem Organismus, wie die Ausscheidung über Niere, Leber, Schweiß, Lunge u.a..

Die **Halbwertszeit** ist die Zeit, in der die Konzentration eines Stoffes in einer Körperflüssigkeit (z.B. Plasma) um die Hälfte abfällt. Die Halbwertszeit kann für die Absorptions-, Verteilungs- und Eliminationsphase eines Stoffes im Körper berechnet werden.

2.9.3 Bioverfügbarkeit

Für den Begriff Bioverfügbarkeit (F) gibt es unterschiedliche Definitionen, die von Rescigno et al. (1994) und Fichtl (1995) zusammengefasst wurden. Demnach kann die Bioverfügbarkeit als ein Maß für die Geschwindigkeit und die Menge der aktiven Substanz eines Arzneistoffes betrachtet werden, die in den großen (systemischen) Körperkreislauf gelangt. Unter der Annahme, dass dieser Anteil gleich dem Teil ist, der tatsächlich zur Wirkung kommt, würden nach intravenöser Applikation 100 % der Substanz dem Organismus zur Verfügung stehen. Bei dem gleichen in anderer Form am selben Tier applizierten Arzneistoff kann demzufolge nur eine kleinere oder gleich große Menge in den Körperkreislauf gelangen. Die absolute Bioverfügbarkeit erfasst daher den Anteil eines extravasal verabreichten Arzneistoffes, der den systemischen Körperkreislauf erreicht. Die Berechnung der absoluten Bioverfügbarkeit erfolgt daher unter Berücksichtigung der gesamten Fläche unter der Blutspiegelkurve (AUC) nach folgenden Formeln:

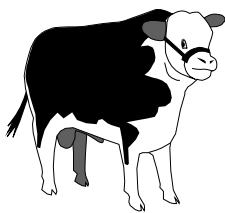
$$F = \frac{AUC_{e.v.}}{AUC_{i.v.}} \quad \text{bzw.} \quad F \% = \frac{AUC_{e.v.}}{AUC_{i.v.}} \cdot 100$$

Wenn sich Parameter, welche die absolute Bioverfügbarkeit beeinflussen, zwischen den Versuchen ändern, können diese Formeln entsprechend korrigiert werden. Korrekturfaktoren können die verabreichte Dosis, das Körpergewicht, die Clearance und/oder die Eliminationsgeschwindigkeitskonstante sein.

2.9.4 Grundsätze für die Planung von Versuchen zur Pharmakokinetik mit Einzeldosierung

Folgende Aspekte sollten bei der Planung von pharmakokinetischen Grunduntersuchungen mit Einzeldosierungen berücksichtigt werden (Koch & Ritschel, 1986; Junginger, 1987; Derendorf & Garrett, 1987; Pfeifer et al., 1995):

a) Mindestens vier **Versuchstiere** sollten zur Verfügung stehen, wobei darauf zu achten ist, dass



- die Versuchstiere gesund sind und unter Standardbedingungen gehalten werden,
- Rasse, Alter, Geschlecht, Gewicht usw. dokumentiert werden,
- die Tiere ausreichend Zeit zur Eingewöhnung erhalten (Akklimationsphase) und
- die jeweils letzte Fütterung ca. 12 Stunden vor Versuchsbeginn erfolgt.

b) Bei der **Applikation** des zu untersuchenden pharmakologischen Stoffes sollte beachtet werden, dass



- zur Untersuchung der absoluten Bioverfügbarkeit möglichst eine jeweils gleich hohe intra- und eine extravasale Dosis verabreicht wird,
- zur Ermittlung von Dispositionsparametern und damit auch zur Ermittlung der Anfangskonzentration im Blutplasma die intravenöse Injektion gewählt wird,
- zur Darstellung von Resorptionsvorgängen eine orale Applikation erfolgt und
- alle vorgesehenen Applikationen an dem selben Tier durchgeführt werden.

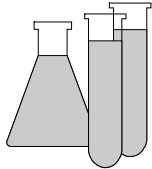
c) Das **Dosierungsschema** sollte berücksichtigen, dass



- mindestens drei verschiedene Dosen getestet werden, wobei, um eine eventuelle Nichtlinearität zu erkennen, die niedrigste Dosis entsprechend der analytischen Empfindlichkeit der Methode festgelegt wird, und die höchste Dosis noch nicht toxisch sein darf (von den Autoren wird die Gabe einer einfachen, doppelten und achtfachen Dosis empfohlen),
- die verschiedenen Dosierungen in einer Cross-over-Anordnung verabreicht werden und

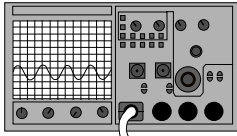
- zwischen den Versuchen eine ausreichend lange Auswaschphase (s. unter 4.1.2) eingehalten wird.

d) Für die **Probenahme** wird empfohlen, dass



- als Untersuchungsmaterial Blutplasma gewählt wird,
- während jeder kinetischen Phase mindestens drei Proben entnommen werden,
- während der Phasen, in denen sich die Wirkstoffkonzentration besonders schnell ändert, die Probenmenge erhöht wird,
- der Konzentrationsverlauf möglichst lange verfolgt wird (mindestens $1/10 C_{pmax}$).

e) Die **Analytik** sollte ausreichend genau sein, um den Konzentrationsverlauf möglichst lange verfolgen zu können.



2.9.5 Pharmakokinetik von Clenbuterol

Untersuchungen beim Menschen durch Zimmer (1976 b) und bei der Ratte durch Kopitar & Zimmer (1976 a) zeigen, dass nach einmaliger oraler Applikation von ^{14}C -Clenbuterol bei beiden ähnliche pharmakokinetische Prozesse ablaufen. Die Resorption von Clenbuterol erfolgte schnell und vollständig. Beim Menschen wurde das Maximum im Blutplasma 2-3 Stunden nach der Applikation festgestellt, bei der Ratte nach 2 Stunden. Der Verlauf folgte beim Menschen einem offenen Zwei-Kompartiment-Modell mit Seitenkompartiment und bei der Ratte einem offenen Zwei-Kompartiment-Modell, die Elimination verlief bei beiden biphasisch. Die Halbwertszeit für alle Prozesse der Invasion betrug beim Menschen 1 Stunde und bei der Ratte 1,2 Stunden, die Eliminationshalbwertszeiten betragen 1 bzw. 1,9 Stunden für die kürzere Phase und 34 bzw. 25 Stunden für die sich anschließende längere Phase. Beim Menschen betrug die Plasmakonzentration nach 48 Stunden noch ca. $1/3$ der Maximalkonzentration. Die Ausscheidung erfolgte hauptsächlich auf renalem Wege. Über den Urin wurden beim Menschen bis 168 Stunden nach der Verabreichung 87 % der Radioaktivität eliminiert, über den Kot dagegen innerhalb von 96 Stunden nur unter 4 %. Die Untersuchungen von Yamamoto und Iwata (1982) bestätigten die maximale Plasmaspiegelkonzentration beim Menschen von 2-3 Stunden nach oraler Gabe von Clenbuterol. Sie fanden nach 72 Stunden noch eine Plasmakonzentration von ca. $1/3$ der Maximalkonzentration.

Im Gegensatz zum Menschen und zu der Ratte folgte der Verlauf der Plasmaspiegelkurve beim Kaninchen und beim Hund nach einmaliger oraler Applikation von ^{14}C -Clenbuterol innerhalb der ersten 9 Stunden, in denen der größte Teil der Radioaktivität ausgeschieden wurde, einem offenen Ein-Kompartiment-Modell (Zimmer, 1976 a). Die Resorption verlief auch hier rasch und vollständig. Die maximale Plasmaspiegelkonzentration wurde bei beiden 3 Stunden nach Applikation erreicht. Die Eliminationshalbwertszeit aus dem ersten Kompartiment betrug beim Kaninchen 1,5 Stunden und beim Hund 1 Stunde. Die Elimination erfolgte ebenfalls hauptsächlich über den Urin. Insgesamt wurden bis 96 Stunden nach Applikation beim Kaninchen 92 % und beim Hund 74 % der Radioaktivität über den Urin ausgeschieden. Die Kotelimination lag bei beiden Tierarten in dieser Zeit unter 5 %. Fujino et al. (1984) ermittelten beim Hund eine biphasische Elimination aus dem Plasma mit Halbwertszeiten von 1,8 und 21,2 Stunden. Bei Kälbern beschrieben Dave et al. (1998) nach Applikation von 2 x täglich 10 μg Clenbuterol pro kg KG über 21 Tage und nach Applikation von 2 x täglich 0,8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG über 10 Tage ebenfalls eine biphasische Elimination aus dem Plasma mit folgenden Halbwertszeiten nach der letzten Applikation:

- therapeutische Dosis \Rightarrow α -Phase: 0,6 h (SD 1,3 h)
 β -Phase: 97,5 h (SD 5,5 h)
- hohe Dosis \Rightarrow α -Phase: 2,3 h (SD 2,2 h)
 β -Phase: 39,8 h (SD 6,7 h)

Rinke (1990) stellte bei 5 Kälbern dagegen nach Applikation von 2 x täglich 5 μg Clenbuterol pro kg KG über 21 Tage nach der letzten Applikation eine lineare Elimination aus dem Plasma mit Halbwertszeiten zwischen 11,6 und 12,5 Stunden fest. Für die biphasische Elimination aus dem Urin erhielt Rinke Halbwertszeiten von 11,3-13,9 Stunden (α -Phase) und von 5,8 Tagen (β -Phase).

Insgesamt wurde übereinstimmend eine schnelle Resorption von Clenbuterol festgestellt. Eisemann et al. (1988) schlossen daraus auf eine Resorption im proximalen Teilen des Gastrointestinaltraktes.

Clenbuterol hat gegenüber anderen β -Agonisten eine besonders lange Wirkungsdauer und eine sehr gute orale Verfügbarkeit (Engelhardt, 1972). Als Ursachen werden die geringe Neigung von Clenbuterol zur Metabolisierung und die feste Bindung an den Rezeptor verantwortlich gemacht (Engelhardt, 1972 und 1976). Clenbuterol kann wegen des voluminösen Substituenten am Stickstoffatom nicht durch die für die oxidativen Reaktionen verantwortliche Monoaminoxidase und wegen der fehlenden phenolischen Hydroxylgruppe nicht durch die für die Methylierungen verantwortliche Catechol-O-Methyltransferase inaktiviert werden (Rinke, 1990). Diese beiden Enzyme sind aber die wichtigsten für solche

Metabolisierungen. Während radioaktiv markiertes Clenbuterol daher zu ca. 40-70 % unmetabolisiert mit dem Urin ausgeschieden wird (s. dazu Punkt 2.9.6), sind es beim natürlichen vorkommenden Adrenalin nur 5 % (Harper et al., 1987).

Clenbuterol wird auch bei Kälbern, Kühen und Pferden hauptsächlich über den Urin ausgeschieden. Die Raten lagen bei Kälbern zwischen 59-66 %, bei Kühen zwischen 47-67 % und bei Pferden um 74 %. Bei Kälbern betrug der Anteil unmetabolisiert ausgeschiedenen Clenbuterols bei 40 % (Heitzman, 1996).

Auch Salbutamol wurde zu 70-80 % mit dem Urin ausgeschieden, wobei davon je nach Applikationsform 20-50 % als Metabolit vorlag. Im Kot waren dagegen nur 10-12 % der verabreichten Dosis enthalten (Evans et al., 1973).

2.9.6 Biotransformation/Metabolismus

Die Biotransformationswege von Arzneistoffen lassen sich meist in zwei Phasen unterteilen. Während der Phase I werden die Moleküle oxidativ, reduktiv, hydrolytisch oder durch Dehalogenierung bzw. Decarboxylierung verändert, wobei Hydroxyl-, Amin-, Sulfhydryl- oder Carboxylgruppen eingeführt oder freigelegt werden. Dadurch entstehenden Primärmetabolite mit verbesserter Hydrophilie, die in der Phase II durch die Verbindung mit körpereigenen Stoffen wie Essigsäure, Aminosäuren, Glucuronsäuren u.ä. in Ester, Amide und Glucuronide überführt werden. Die dadurch entstehenden Sekundärmetabolite können durch ihre gute Wasserlöslichkeit besser ausgeschieden werden (Koch & Ritschel, 1986; Derendorf & Garrett, 1987; Pfeifer et al., 1995).

Clenbuterol zählt zu den β_2 -Agonisten mit geringer Polarität. Diese sind charakterisiert durch therapeutische Aktivitäten bereits bei niedrigen oralen Dosierungen und durch eine relativ langsame Elimination aus dem Plasma. Sie werden hauptsächlich als Phase I-Metaboliten über den Urin ausgeschieden (Zimmer, 1976 b; Poletini, 1996). Im Gegensatz zum Clenbuterol sind bei stark polaren β_2 -Agonisten wie Salbutamol und Ritodrin höhere Dosen zum Erreichen einer therapeutischen Wirksamkeit notwendig. Außerdem sind sie durch signifikant kürzere Halbwertszeiten im Plasma gekennzeichnet (Poletini, 1996, Finkelstein, 1981). Die Exkretion erfolgte zu 35-90 % als Phase II-Metaboliten in Form von Glucuroniden und Sulfaten über den Urin (Evans et al., 1973).

Die ersten ausführlichen Studien über das Metabolitenmuster von Clenbuterol im Urin, im Kot und im Plasma führten Zimmer & Kopitar bei Ratten, Hunden, Kaninchen und beim Menschen durch. Sie fanden neben dem unmetabolisiert vorliegenden Clenbuterol bis zu 8

Metaboliten. In Tabelle 9 sind anhand der quantitativen Verteilung der Radioaktivität von ^{14}C -Clenbuterol die Metaboliten im Sammelurin und im Plasma dargestellt. Alle Proben wurden in verschiedenen Extraktionsphasen bei basischem, saurem bzw. neutralem pH-Wert aufgearbeitet, wobei aus jeder Phase Metaboliten extrahiert werden konnten. Der Kot von Ratten wies ein ähnliches Metabolitenmuster wie deren Urin auf (Kopitar & Zimmer, 1976 a).

Tabelle 9 Quantitative Verteilung der Radioaktivität von ^{14}C markiertem Clenbuterol (Angaben in Prozent)

Substanz	Sammelurin über				Plasma		
	0-72 h		0-24 h		0-24 h		0-48 h
	Kopitar & Zimmer, 1976 a und b				Zimmer, 1976 a und b		
	a		b		a		b
Ratte	Hund	Kaninchen	Mensch	Ratte	Hund	Kaninchen	
Phase	in %	Phase	in %	Phase	in %	Phase	in %
unmetabolisiertes Clenbuterol	I 69,7	I+III 41,1	I+III 67,1	I 66,4	I 45,2	I+III 32,8	I+III 39,4
Metabolit 1	I 0,6	I 1,0	I 2,0	III 0,8	I 0,6	I 0,9	I 1,0
Metabolit 2	I -	I 0,2	I 0,3	I -	I 0,3	I 0,3	I -
Metabolit 3	I -	I -	I -	I -	I -	I -	I -
Metabolit 4	II 0,9	II 6,2	II 2,2	II 3,5	II 1,1	I 2,8	I 0,3
Metabolit 5	II 1,6	I 1,3	I 0,5	I -	II 1,1		
Metabolit 6	I 0,2	I 0,2	I 0,5	III 1,2	I 2,5	I 2,7	I 0,1
Metabolit 7	II 0,9	II 15,4	II 5,6	II 5,4	II 0,8	II 5,3	II 0,4
Metabolit 8	II 5,4	II 3,9	II 1,4	II 2,7	II 4,8	II 0,1	II 0,9
undefiniert	III 7,8	III 9,0	III 9,3	III 6,2	III 22,1	III 32,6	III 24,4
undefinierte Restradioaktivität	12,9	21,7	11,1	13,8	21,5	22,5	33,5

Phase I: basische Extraktionsphase
 Phase II: saure Extraktionsphase
 Phase III: neutrale Extraktionsphase

Schmid et al. (1990) haben detaillierte Untersuchungen zur Biotransformation von Clenbuterol im Urin vom Hund und zur Bestimmung der einzelnen Metaboliten durchgeführt. Sie sammelten den Urin über 48 h und konnten 88 % der verabreichten Dosis wiederfinden. 98 % der Ausscheidungsprodukte wurden identifiziert (Abbildung 6). Davon lagen 24 % als Muttersubstanz und 72,7 % als Metaboliten vor. Von den Metaboliten waren 60,5 % Oxidations- bzw. Hydrolyseprodukte aus Phase I und 12,2 % polare und weniger polare Konjugationsprodukte aus Phase II. Lediglich für das NA 1141 konnte unter den Metaboliten bisher pharmakologische Aktivität nachgewiesen werden.

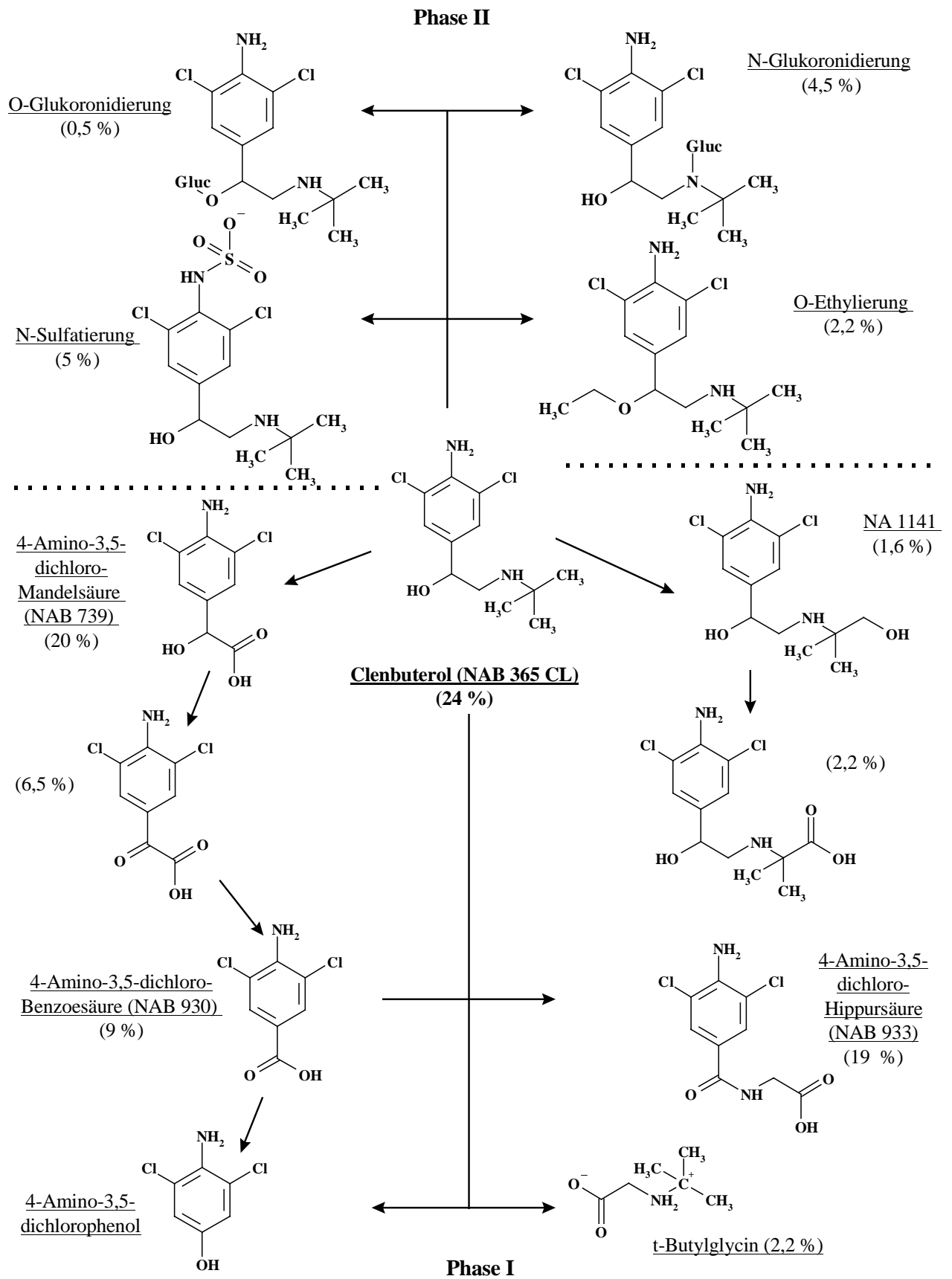


Abbildung 6 Metabolitenmuster von Clenbuterol im Urin vom Hund (modifiziert nach Schmid et al., 1990)

Zalko et al. (1996) fanden in neueren Untersuchungen an Ratten und Kälbern im Urin der Ratten bis 7 Tage 38 % und beim Kalb bis 48 Stunden 45 % der oral verabreichten ^3H -Clenbuteroldosis wieder. Die Differenzierung zeigte, dass bei der Ratte unverändertes Clenbuterol zu 20-25 % und 9 Metaboliten (der stärkste zu 30-40 %) und beim Kalb 40 % als Muttersubstanz und nur 2 Metaboliten (zu 40 und 15 %) vorlagen. Im Kot betrug die Wiederfindung 17 % (Ratte) bzw. unter 2 % (Kalb). Nach oraler Applikation von ^{14}C -Clenbuterol beim Kalb konnten von Zalko et al. (1998) neben der Muttersubstanz (zu 24,3 %) und den bereits bekannten Hauptmetaboliten (zu 36,6 und 19,4 %) auch noch 4 weitere Metaboliten (zu 1,8; 4,9; 3,3 und 4,0 %) analysiert werden.

Horiba et al. (1984) untersuchten die Metaboliten von ^{14}C -Mabuterol im Urin von Ratten. 74,3 % der Radioaktivität wurden innerhalb der ersten 24 h ausgeschieden. Davon konnten 79,2 % eluiert werden. Aus dem Eluat wurden 28,4 % der Strukturen nach der basischen, 24,0 % nach der sauren und 26,8 % nach der neutralen Fraktion quantifiziert. Neben Mabuterol wurden 6 Metaboliten identifiziert, von denen lediglich der Metabolit 1 (Hydroxylierung an der tert Butyl-Gruppe) pharmakologische Effekte zeigte.

Evans et al. (1973) konnten im Plasma nach Applikation von ^3H -Salbutamol einen Metaboliten mit pharmakologischer Aktivität nachweisen, der nach oraler Gabe bzw. Gabe als Aerosol in vierfach höherer Konzentration im Plasma vorlag als Salbutamol. Lediglich nach intravenöser Applikation war die Konzentration von Salbutamol höher als die des Metaboliten.

2.10 RÜCKSTANDSNACHWEISVERFAHREN

In der Humanmedizin werden β_2 -Agonisten bereits seit 25 Jahren eingesetzt. In Deutschland ist Clenbuterol seit 1978 (Clenovet[®]) für die Tierproduktion zu therapeutischen Zwecken zugelassen. Seit Mitte der 80iger Jahre wurden in verschiedenen Studien die anabolischen Effekte von β_2 -Agonisten in hohen Dosen nachgewiesen (s. unter 2.4.2) und erste Fälle des illegalen Einsatzes bei Kälbern in Deutschland bekannt (s. unter 2.7). Seitdem sind verstärkt Methoden zu deren Nachweis entwickelt worden. Während das Hauptaugenmerk in der Humanmedizin vor allem auf die Untersuchung von Plasma, Urin und Haaren zur Anti-Doping-Kontrolle gerichtet war (Poletini, 1996), wurde in der Tierproduktion im Hinblick auf den Verbraucherschutz die Überwachung auch auf die Kontrolle der Schlachtkörper ausgerichtet.

Da die Anwendung von β_2 -Agonisten, ausgenommen beim eingeschränkten Einsatz von Clenbuterol zu therapeutischen Zwecken, bei Tieren, die der Lebensmittelgewinnung dienen,

verboten ist, müssen die Analysetechniken möglichst empfindlich sein, d.h. die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sollten im unteren ng/ml-Bereich liegen.

Seit Anfang der 80iger wurden eine Vielzahl von Screening- und Bestätigungsmethoden entwickelt.

Bei den Screeningmethoden stand die Suche nach preiswerten Verfahren mit hohem Probendurchsatz im Vordergrund des Interesses. Die Verfahren sollten möglichst viele potentiell als Anabolikum geeignete β_2 -Agonisten gleichzeitig erfassen. Inzwischen werden eine Reihe ELISA-Testkits für Clenbuterol und andere β_2 -Agonisten als Screeningverfahren kommerziell angeboten. Hahnau & Jülicher (1996) haben 10 dieser kommerziell verfügbaren ELISA-Testkits hinsichtlich ihrer Leistungsfähigkeit in einer umfassenden Studie überprüft. Die Studie ergab erhebliche Qualitätsunterschiede bei den einzelnen Testkits. Obwohl die Herstellerangaben von Hahnau & Jülicher teilweise nicht bestätigt werden konnten, war die Leistungsfähigkeit der meisten Testkits zufriedenstellend.

Die Bestätigungsmethoden dienen vor allem der Absicherung positiver Screeningergebnisse. Daher wird nach Verfahren zur exakten Identifizierung eines β_2 -Agonisten bei hoher Empfindlichkeit gesucht. Im Vergleich zu Screeningmethoden sind Bestätigungsmethoden jedoch kostenaufwendiger und erlauben einen geringeren Probendurchsatz.

Analytische Schwierigkeiten bereitete die starke Polarität der meisten β_2 -Agonisten. Die unterschiedliche Reaktivität und Basizität der Substanzen stellte sich vor allem bei der Aufarbeitung des Untersuchungsmaterials als Problem dar (Edelhäuser & Scherbaum, 1991). Während zum Beispiel Clenbuterol basisch ist, besitzt Salbutamol einen amphoteren Charakter, so dass unterschiedliche Extraktionsschritte zur Reinigung der Substanzen vorangestellt werden müssen.

Einen Überblick über die Methoden zum Nachweis von β_2 -Agonisten geben Schothorst & Stephany (1990) für die Jahre 1976 bis 1989 und Poletini (1996) für die Jahre 1985 bis 1996. Schothorst & Stephany (1990) geben einen Gesamtüberblick über die wichtigsten Methoden zum Nachweis von Clenbuterol, Cimaterol, Salbutamol, Terbutalin und Ractopamin. Im Vordergrund der Recherche von Poletini (1996) standen die Extraktionsverfahren für β_2 -Agonisten aus Urin, Plasma und Haaren sowie die sich daran anschließende instrumentelle Analytik mittels GC-MS, GC-MS-MS, LC-MS und LC-MS-MS.

Tabelle 10 gibt einen Überblick über die Methoden der letzten Jahre, die von Schothorst & Stephany (1990) und Poletini (1996) noch nicht erfasst wurden. Aufgeführt sind vor allem die wichtigsten Nachweismethoden für Clenbuterol.

Tabelle 10, Seite 1 Übersicht über Veröffentlichungen der letzten Jahre im Hinblick auf analytische Methoden zum Nachweis von β_2 -Agonisten

Methoden	Autor	Jahr	β -Agonist	Material
RIA	Delahaut et al.	1990	Clenbuterol	Urin
	Delahaut et al.	1991	Clenbuterol	Urin, Plasma, Kot
EIA	Delahaut et al.	1990	Clenbuterol	Urin
	Rinke	1990	Clenbuterol, Salbutamol, Cimaterol	Urin, Plasma
	Meyer et al.	1991	Clenbuterol, Salbutamol, Cimaterol	Urin
	Degand et al.	1992	Clenbuterol	Urin, Leber
	Dürsch	1992	Clenbuterol, Salbutamol, Terbutalin, Mabuterol	verschiedene Gewebe und Körperflüssigkeiten
	Sauer et al.	1993	Clenbuterol	Urin, Leber, Auge
	Sauer & Anderson	1994	Clenbuterol	Haar
	Blass et al.	1996	Clenbuterol	Plasma
	IAC/ EIA	Pickett & Sauer	1992	Clenbuterol
ELISA	Bucknall et al.	1992	verschiedene β -Agonisten	Leber
	Hagedorn et al.	1995	Clenbuterol	Urin, Serum
DC	Brunn	1988	Clenbuterol	Urin
	Layer & Friedrich	1989	Salbutamol	Urin
LC	Wannerberg & Persson	1988	Bambuterol	Standard
TLC MS-MS	Henion & Maylin	1983	Clenbuterol	Urin
HPLC	Hageman et al.	1983	Reproterol	Plasma
	Hauck & Brugger	1989	Clenbuterol	Plasma
	Degroodt et al.	1989	Clenbuterol	Urin
	Haasnoot et al.	1990	Clenbuterol	Urin
	Rinke	1990	Clenbuterol, Salbutamol, Cimaterol	Urin, Plasma
	Hooijerink et al.	1991	Clenbuterol	Urin
	Degroodt et al.	1991	Clenbuterol, Cimaterol	Urin
	Meyer et al.	1991	Clenbuterol, Salbutamol, Cimaterol	Urin
	Moretti et al.	1993	Clenbuterol	Leber
	Sauer & Anderson	1994	Clenbuterol	Haar
	HPTLC	Degroodt et al.	1989	Clenbuterol
Degroodt et al.		1991	Clenbuterol, Cimaterol	Urin
De Groof et al.		1991	Salbutamol	Urin, Leber
GC	Steinwandter	1989	Clenbuterol	Futtermittel
GC-MS	Fürst et al.	1989b	Clenbuterol	Urin, Leber, Muskel, Futtermittel
	Fürst et al.	1989a	Salbutamol	Urin
	Layer & Friedrich	1989	Salbutamol	Urin

Tabelle 10, Seite 2 Übersicht über Veröffentlichungen der letzten Jahre im Hinblick auf analytische Methoden zum Nachweis von β_2 -Agonisten

GC-MS	Leysens et al.	1991	verschiedene β -Agonisten	Urin, Leber
	Edelhäuser & Scherbaum	1991	verschiedene β -Agonisten	Standards
	Moretti et al.	1993	Clenbuterol	Leber
	Blanchflower et al.	1993	Clenbuterol	Urin, Leber, Muskel, Retina
	Polettini et al.	1991	Clenbuterol	Urin
	Wilson et al.	1994	Clenbuterol	Leber, Muskel
IAC/ GC-MS	Schilt et al.	1990	Clenbuterol, Salbutamol, Terbutalin, Cimaterol	Urin, Leber, Futtermittel
	van Ginkel et al.	1989, 1992	Clenbuterol, Salbutamol, Terbutalin, Carbuterol, Pirbuterol	Urin, Leber, Futtermittel
GC-FTIR	Visser et al.	1993	Clenbuterol, Salbutamol, Mabuterol, Brombuterol, Cimaterol, Cimbuterol und Mapenterol	Urin, Leber