

Rapport 92.49

augustus 1992

DE WERKING VAN BETA-AGONISTEN ALS GROEIBEVORDERAARS

drs. J.F. de Vlieger*

* Vrije Universiteit Amsterdam
Afdeling Farmacochemie

DLO-Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT-DLO)
Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen
Postbus 230, 6700 AE Wageningen
Telefoon 08370-75400
Telex 75180 RIKIL
Telefax 08370-17717

Copyright 1992, DLO-Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten.
Overname van inhoud toegestaan mits met duidelijke bronvermelding.

VERZENDLIJST

INTERN:

directeur

hoofden onderzoekafdelingen

dr. F.A. Huf (3x)

drs. R. Schilt (2x)

dr. M.J. Groot (2x)

public relations en secretariaat (2x)

circulatie

bibliotheek (3x)

EXTERN:

Mw. drs. J.F. de Vlieger (VU)

RIVM

RIVM, sector stoffen en risico's

TNO-Voeding

Stichting Kwaliteitsgarantie Vleeskalversector

Veterinaire Hoofd Inspectie

Benelux Werkgroep Hormonen

Directie Milieu, Kwaliteit en Voeding (LNV)

Veterinaire Dienst

Directie Veehouderij en Zuivel (LNV)

Algemene Inspectie Dienst (LNV)

Directie Wetenschap en Technologie (LNV)

Dienst Landbouwkundig Onderzoek

Rijksdienst voor de keuring van Vee en Vlees

Centraal laboratorium Rijksdienst voor de keuring van Vee en Vlees

Landbouw Advies Commissie milieukritische stoffen

resp. Stuurgroep Vee, Vlees, Eieren

Werkgroep Diergeneesmiddelen

Produktschap Vee en Vlees

Produktschap voor Veevoeder

VOORWOORD

Het gebruik van groeibevorderaars in de dierlijke produktie leidt tot beduidend hogere winsten voor de mester. Om deze reden is het voor de kalvermesters al vele jaren interessant om deze stoffen toe te passen.

In de laatste jaren is gebleken dat het arsenaal groeibevorderaars is uitgebreid met de β -agonisten. Clenbuterol, salbutamol, cimaterol en ractopamine zijn inmiddels bekende voorbeelden van anti-asmatica die vanwege de herverdelende werking worden toegepast: de spiergroei aanzet en de vetafbraak worden bevorderd. Over de precieze werking van de β -agonisten in dit verband is nog onvoldoende bekend. Daarom zijn de risico's die zijn verbonden aan de consumptie van vlees van behandelde dieren, moeilijk in te schatten. Zolang de concentraties van de residuen van de β -agonisten laag zijn, zullen de effecten voor de consument gering zijn: vele astma-patiënten maken immers regelmatig en langdurig gebruik van deze stoffen. Hogere concentraties in vlees kunnen in de praktijk echter voorkomen en in Spanje zijn acute voedselvergiftigingen waargenomen na het eten van runderlever: hartkloppingen en spiertremoren, terug te brengen tot de aanwezigheid van clenbuterol (Martinez-Navarro, 1990). Een strenge controle op de afwezigheid van β -agonisten is derhalve van belang, niet alleen om de volksgezondheid te beschermen maar ook voor het imago van vlees en vleesprodukten.

Een adequate controle moet worden gebaseerd op steekproeven die voldoende groot zijn om representatief geacht te worden. Het gaat dan om duizenden monsters per jaar. Om de keuringskosten acceptabel te houden, moeten goedkope screeningsmethoden worden ontwikkeld die de verdachte exemplaren uit de monsters selecteren. Een bijkomende eis aan een screeningsmethode op β -agonisten is dat ook nieuwe, nog niet bekende stoffen met β -agonisten c.q. herverdelende werking, kunnen worden opgespoord. De synthese van deze stoffen is relatief eenvoudig en er zijn al chemische varianten ontdekt van de eerder genoemde voorbeelden. Met deze nieuwe stoffen kunnen slechtwillende producenten langere tijd door de mazen van het keuringsnet ontsnappen omdat met de huidige analysemethoden de nieuwe stoffen niet zondermeer gevonden behoeven te worden.

Een nieuwe strategie in de analytische aanpak is daarom gewenst, waarbij twee routes naar het gestelde doel kunnen leiden. Enerzijds kan worden gezocht naar de receptor die op cel-niveau de herverdelende werking in gang zet. Deze receptor kan dan worden toegepast in een Competitieve Receptor Assay, analoog aan het gebruik van anti-lichamen in immuno assays. Anderzijds kan worden gezocht naar verandering in het metabolisme waardoor het metabole profiel in de urine verandert. Bekend is bijvoorbeeld dat bij gebruik van β -agonisten het stikstofgehalte in de urine verhoudingsgewijs afneemt. De noodzaak van deze multi-screenings methoden op een effect gerichte basis, wordt door het volgende onderstreept. Omdat het relatief eenvoudig is om nieuwe varianten van β -agonisten te synthetiseren ontstaan gemakkelijk geheel nieuwe risico's voor de

volksgezondheid. Immers, deze stoffen worden toegepast zonder enige vorm van toxicologische evaluatie waardoor de effecten op de consument onvoorspelbaar zijn.

Vanuit de hier geschetste problematiek is in een samenwerkingsverband tussen RIKILT-DLO en de Vrije Universiteit Amsterdam mevrouw drs. J.F. de Vlieger begonnen met een studie die geleid heeft tot dit rapport. Hierin wordt op heldere wijze de vertaalslag gemaakt vanuit de farmacochemie naar de keuringsproblematiek. De enthousiaste begeleiding door prof. dr. A. Bast van de VU heeft daar in niet geringe mate aan bijgedragen.

Dr. F.A. Huf
RIKILT-DLO

INHOUDSOPGAVE

pagina:

HOOFDSTUK 1: INLEIDING

1.1 Het adrenerge systeem	6
1.2 Endogene β -agonisten	6
1.3 Adrenerge receptoren	7
1.4 Verschillende typen β -receptoren	8
1.5 Structuur en classificatie van β -agonisten	9
1.6 β -agonisten als groeibevorderaars	11

HOOFDSTUK 2: ANABOLE EFFECTEN VAN BETA-AGONISTEN

2.1 Inleiding	12
2.2 Effecten op spierweefsel	12
2.3 Mechanisme van de anabole werking op spierweefsel	13
2.3a Aanwijzingen voor een direct mechanisme: <i>in vivo</i> - en <i>in vitro</i> -onderzoek	14
2.4 Effecten op vetweefsel	17
2.5 Werkingsmechanisme	18
2.5a Knaagdieren	18
2.5b Zoogdieren gebruikt in de vleesproductie	18
2.5c Kippen	19
2.6 Thermogenese	19
2.6a Bruin vet	20
2.6b Andere thermogene organen	20
2.7 Andere effecten van β -agonisten	21
2.8 Intracellulaire werking van β -agonisten	21

HOOFDSTUK 3: BETA-RECEPTOREN

3.1 Inleiding	23
3.2 Subtypes β -adrenerge receptoren	24
3.3 Bijzondere DNA-structuren op de β -receptor	25
3.4 Desensitisatie	26
3.5 Localisatie van subtypes β -adrenerge receptoren	26
3.5a Verschillen tussen species	28
3.5b Onderzoek met nieuwe β -agonisten	29

HOOFDSTUK 4: RECEPTOR-BINDING VAN BETA-AGONISTEN

4.1 Receptoractivatie	32
4.2 Bepaling van de potentie van β -agonisten (op een β_2 -systeem)	33
4.3 Selectiviteit in werking van β -agonisten	33
4.4 Verschillende soorten interacties van onnatuurlijke β -agonisten met de β_2 -receptor	34
4.5 Structuur van β -agonisten	39

4.6 De ligand-bindingsplaats	40
HOOFDSTUK 5: HORMOONREGULATIE DOOR BETA-AGONISTEN	
5.1 Inleiding	45
5.2 Insuline	47
5.3 Groeihormoon	47
5.4 Sexhormonen	48
5.5 Schildklierhormonen	48
5.6 Prostaglandines	48
5.7 Glucocorticoïden	48
5.8 Samenvatting	49
5.9 Regulatie van de β -receptor	50
HOOFDSTUK 6: CONCLUSIES	51
LITERATUURLIJST	53
APPENDIX: Structuren van β -agonisten	61

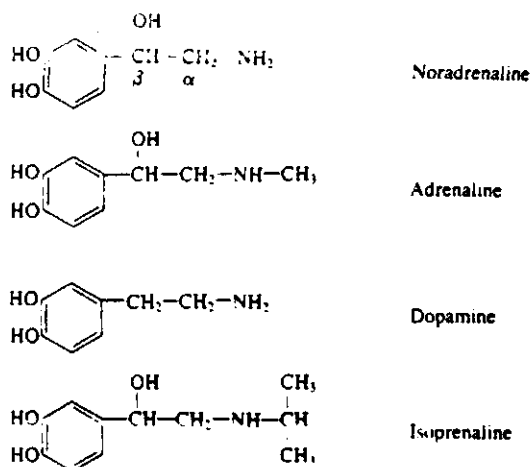
HOOFDSTUK 1: INLEIDING

1.1 Het sympatische of adrenerge systeem

Het autonome zenuwstelsel kan worden opgedeeld in een sympatisch en parasympatisch deel. In rust is het parasympatische deel actief, terwijl bij fysieke inspanning het sympatische deel actief wordt. Beta-agonisten (ook bekend als β -mimetica) vertonen sympatische activiteit. Het sympatische systeem, dat ook wel het adrenerge systeem wordt genoemd, heeft als belangrijkste activiteiten de stimulatie van hartfunctie, de relaxatie van bloedvaten en enkele gladde spieren, en beïnvloeding van metabole processen.

1.2 Endogene β -agonisten

Er zijn twee fysiologische stoffen gevonden die endogeen werkzaam zijn als β -agonisten. Deze stoffen, behorend tot de klasse van catecholamines, zijn noradrenaline en adrenaline genoemd (zie figuur 1).



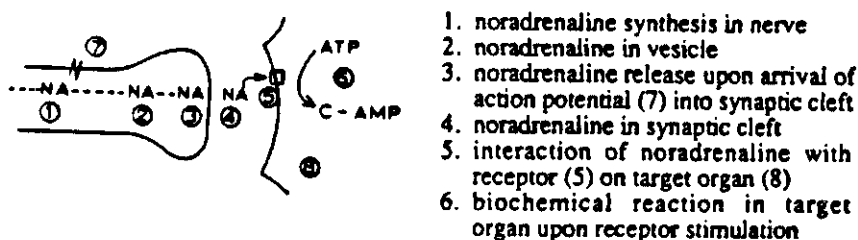
Figuur 1. Structuren van de belangrijkste catecholamines.

De endogene β -agonisten kunnen op twee manieren werkzaam zijn. Noradrenaline kan als neurotransmitter (boodschapper) na stimulatie uit bepaalde zenuwuiteinden worden vrijgezet. Maar zowel noradrenaline als adrenaline kunnen ook als hormoon werkzaam zijn: bij activatie van het sympatische systeem kunnen zij uit de bijnier worden afgescheiden in de bloedbaan (in een verhouding van 4:1 van adrenaline: noradrenaline). De twee catecholamines werken selectief op enkele organen doordat er op bepaalde cellen specifieke adrenerge receptoren aanwezig zijn, waaraan zij kunnen binden [Timmerman, 1987].

Een belangrijke functie van β -agonisten bleek de verwijding van de bronchiën te zijn. Dus werd al snel naar synthetische analoga van de catecholamines gezocht voor gebruik in de therapie bij astma. Tegenwoordig is een heel scala aan β -agonisten gesynthetiseerd, waarvan isoprenaline een zeer bekende is (zie figuur 1 [Rang and Dale, 1987]); deze zullen in hoofdstuk 4 nader besproken worden.

1.3 Adrenerge receptoren

Op allerlei organen zijn bindingsplaatsen voor β -agonisten ontdekt: de zogenaamde adrenerge receptoren. In het sympatische systeem kunnen er echter twee verschillende receptorsystemen worden onderscheiden. Als er door aankomst van een actiepotentiaal in het zenuwuiteinde transmitter wordt vrijgezet (bijvoorbeeld noradrenaline), komt deze stof in de synapsspleet en kan het daarna binden met een receptor op het membraan van cellen op het doelorgaan (zie figuur 2).



Figuur 2. Noradrenaline als neurotransmitter.

Bij bepaalde receptoren resulteert deze interactie in activatie van het enzym adenylaacyclase, die ATP in cAMP omzet. Dit cAMP wordt de 'second messenger' genoemd: het is een intracellulaire boodschapper die bepaalde enzymen fosforyleert, wat uiteindelijk tot een intracellulair effect leidt. Dit type receptoren zijn β -receptoren, en worden onder meer gevonden in het hart, bloedvaten, de uterus, vetcellen en skeletspieren.

Andere adrenerge receptoren zijn de zogenaamde α -receptoren. Deze receptoren zijn niet verbonden met het adenylaacyclasesysteem: receptorbinding veroorzaakt de hydrolyse van fosfatidylinositol, die een influx van Ca^{2+} -ionen in de cel bewerkstelligt. Deze Ca^{2+} -ionen dienen in de cel als 'second messenger'.

Endogeen worden zowel α - als aan β -receptoren gestimuleerd door de neurotransmitter noradrenaline. Hoewel adrenaline geen neurotransmitter is kan ook deze stof adrenerge receptoren stimuleren. Voornamelijk stimuleren deze catecholamines echter de β -receptoren, zodat intracellulair de hoeveelheid cAMP toeneemt.

Ook empirisch konden verschillen gevonden worden in α - en β -receptoren door de potentie van enkele catecholamines op verschillende organen te meten.

Ahlquist (1948) gebruikte isoprenaline, adrenaline en noradrenaline op hart en glad spierweefsel om het bestaan van twee verschillende soorten receptoren aan te tonen:

<u>Receptor</u>	<u>Volgorde van agonist-potentie</u>
α	noradrenaline>adrenaline>isoprenaline
β	isoprenaline>adrenaline>noradrenaline

1.4 Verschillende typen β -receptoren

Er zijn β -receptoren die tot het sympatische systeem behoren en er zijn hormonale β -receptoren. Empirisch zijn er echter ook verschillen in β -receptoren gevonden. Daartoe heeft Lands in de zestiger jaren op dezelfde wijze als Ahlquist (zie boven) met 15 β -agonisten op allerlei organen de potentievolgorde bepaald. Aan de hand van deze gegevens kon Lands een opsplitsing aantonen van de β -receptoren in de subtypen β_1 en β_2 . Voor de stimulatie van hartfunctie waren voornamelijk β_1 -receptoren verantwoordelijk, en op bronchiaal weefsel waren voornamelijk β_2 -receptoren verantwoordelijk voor de relaxatie. De verdere classificatie van β -receptoren op allerlei organen staat weergegeven in tabel 1 [Timmerman, 1987].

Tabel 1. De aanwezigheid van β_1 - en β_2 -receptoren in verscheidene weefsels en organen.

Organ	Receptor type	Effect
Heart	$\beta_1 > \beta_2$	positive inotropic chronotropic, dromotropic
Bloodvessels	$\beta_2 > \beta_1$	relaxation
G-I tract	$\beta_2 > \beta_1$	relaxation
smooth muscles	$\beta_2 > \beta_1$	relaxation
sfincters	$\beta_2 > \beta_1$	relaxation
Bronchial muscles	$\beta_2 > \beta_1$	relaxation
Uterus	$\beta_2 > \beta_1$	relaxation
Kidneys	$\beta_1 > \beta_2$	renin release
Metabolism		
fat cells	$\beta_2 > \beta_1$	lypolysis
skeletal muscle	$\beta_2 > \beta_1$	glycogenolysis
pancreas	$\beta_2 > \beta_1$	insulin release
liver	$\beta_2 > \beta_1$	glycogenolysis

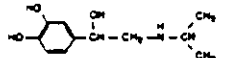
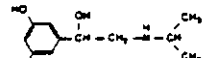
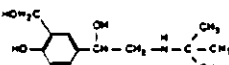
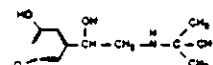
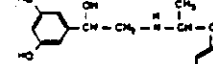
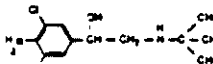
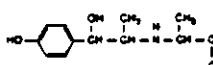
Uit de potentievolgorde van noradrenaline, adrenaline en isoprenaline zou men kunnen concluderen dat de β_1 -receptor bij het sympatische systeem hoort en de β_2 -receptor een hormoonreceptor is, aangezien de neurotransmitter noradrenaline zwak op β_2 en sterk op β_1 actief is, terwijl isoprenaline en adrenaline op beide actief zijn. Dan zou dus de β -receptor op het hart bij het sympatische systeem horen, terwijl de receptoren op longen en vetcellen hormoonreceptoren zouden zijn.

1.5 Structuur en classificatie van β -agonisten

In het begin van deze eeuw werd noradrenaline ontdekt als neurotransmitter van het sympatische systeem. Analoga van deze stof werd later geïntroduceerd om astma mee te behandelen. Begrijpelijk vertoonden deze stoffen veel neveneffecten. Deze konden echter worden verminderd door de introductie van β -agonisten zonder α -effecten (mogelijk gemaakt door de ontdekking van Ahlquist van α - en β -receptoren). Toch veroorzaakte één bijwerking bij gebruik van stoffen als isoprenaline nog steeds problemen: de β -receptor op het hart werd gestimuleerd. Door de differentiatie van Lands in β_1 - en β_2 -receptoren, werd het mogelijk om ook dit probleem te omzeilen, door alleen β_2 -agonisten te gebruiken voor de therapie bij astma.

Niet alleen bij astma zijn β_2 -agonisten toegepast, maar ook als relaxatiemiddel van de uterus bij preventie van abortus. Bij het falen van hartfunctie kunnen β_1 -agonisten worden gebruikt. Een aantal klinisch toegepaste β -agonisten staan hieronder vermeld (zie tabel 2).

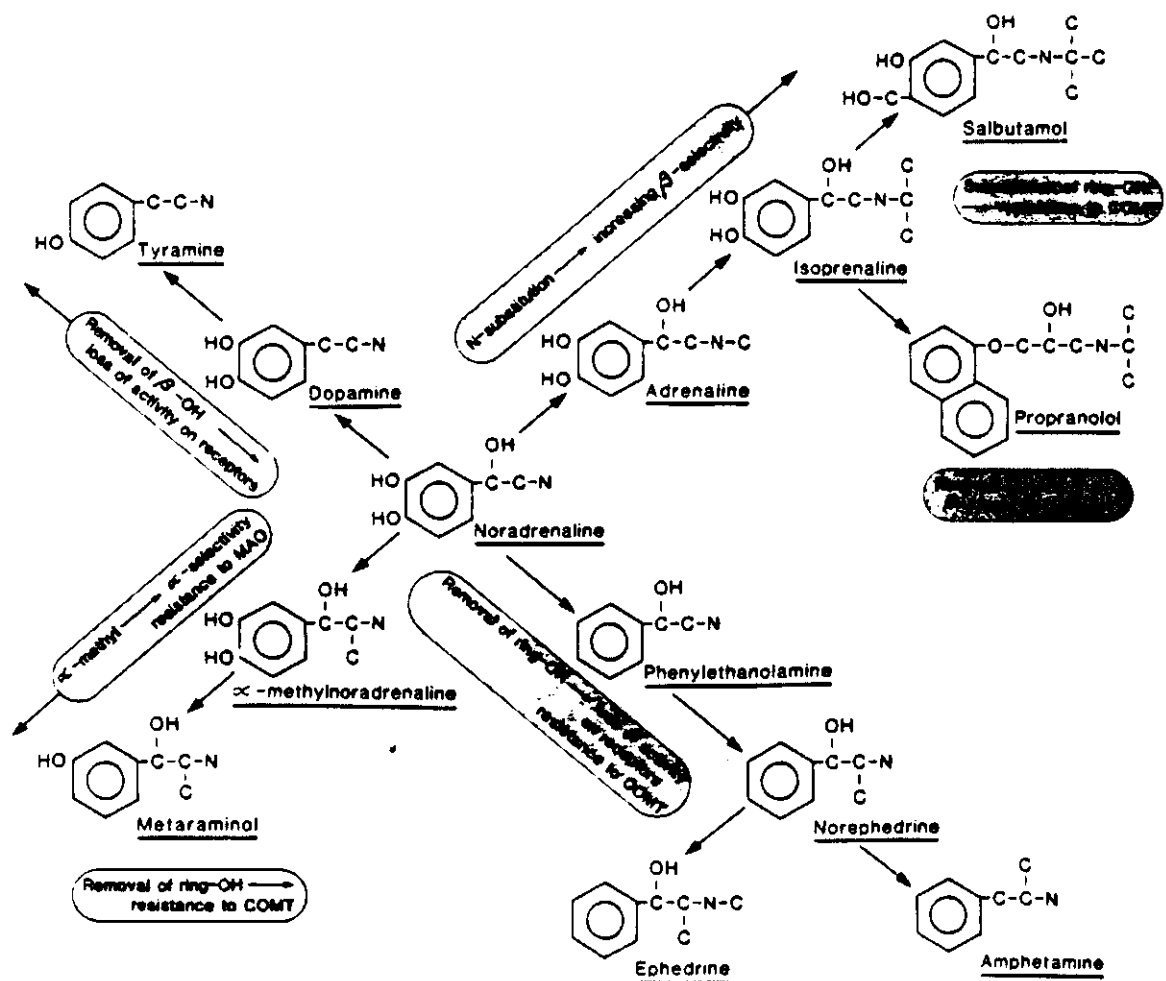
Tabel 2. Structuren en classificatie van enkele β -agonisten.

Formule	Name	$\beta_2 - \beta_1$
	isoprenaline	$\beta_2 \sim \beta_1$
	orciprenaline	$\beta_2 \sim \beta_1$
	salbutamol	$\beta_2 > \beta_1$
	terbutaline	$\beta_2 > \beta_1$
	fenoterol	$\beta_2 > \beta_1$
	clenbuterol	$\beta_2 > \beta_1$
	isoxuprine	$\beta_2 > \beta_1$
	prenalterol	$\beta_1 > \beta_2$
	dobutamine	$\beta_1 > \beta_2$

Voor structuur-activiteitsrelaties blijken de volgende functies van belang (zie figuur 3):

- Een catecholdeel of een ander aromatisch systeem
- Als zijketen een aminoethanol- of oxy-aminopropanolgroep
- De N-substituenten moeten groter of gelijk zijn aan isopropyl, om α -receptorstimulatie te vermijden
- Om enzymatische degradatie te vermijden kunnen de volgende stappen worden ondernomen: a) Door substitutie of weglating van de catechol-OH-groepen kan afbraak door COMT (Catechol-O-MethylTransferase) voorkomen worden. b) Door de N-zijketen te vergroten en/of een α -methylgroep-additie kan afbraak door MAO (MonoAmine Oxidase) voorkomen worden.

Het blijkt moeilijk te zijn om een goede parameter voor activiteit te vinden. Op dit probleem wordt nader ingegaan in hoofdstuk 4.



Figuur 3. Structuur-activiteitsrelaties tussen catecholamines en verwante stoffen.

1.6 Beta-agonisten als groeibevorderaars

Zoals in het voorwoord al werd vermeld worden β -agonisten de laatste jaren misbruikt als groeibevorderaars; niet alleen hebben deze stoffen dus effecten op hart, long en bloedvaten, ook kunnen zij metabole processen beïnvloeden. Door het vet- en spiermetabolisme te beïnvloeden werken zij groeibevorderend.

Het doel van dit rapport is de werking van β -agonisten als groeibevorderaar te verhelderen. De anabole werking kan echter op verschillende manieren benaderd worden. In hoofdstuk 2 zal aandacht worden besteed aan de anabole effecten die β -agonisten zouden kunnen hebben, waarbij onder meer zal worden gelet op intracellulaire effecten. Bij hoofdstuk 3 zal echter een andere benadering worden gebruikt: hier zal worden bekeken welke β -receptoren betrokken zijn bij de anabole effecten, hoe ze er uit zien en waar ze zich bevinden. Hoofdstuk 4 betreft de binding van β -agonisten aan hun receptor: structuur, activiteit en selectiviteit komen aan de orde, waarna ook de ligand-bindingsplaats op de receptor nader bekeken wordt. In hoofdstuk 5 zal onderzocht worden of β -agonisten effect hebben op de hormoonstatus en zo op indirecte wijze anabole effecten kunnen veroorzaken. Tot slot zullen enkele conclusies worden getrokken omtrent de voorafgaande hoofdstukken.

HOOFDSTUK 2: ANABOLE EFFECTEN VAN BETA-AGONISTEN

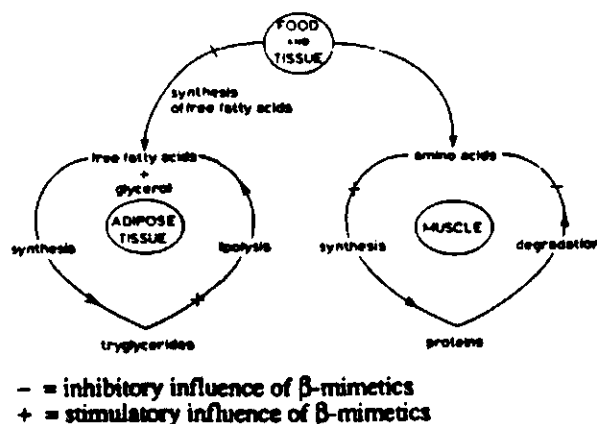
2.1 Inleiding

Tot voor kort was niet bekend dat β -agonisten een anabole werking konden hebben. Bij het gebruik van deze stoffen in de therapie bij astma was een dergelijke werking niet opgemerkt [Offerhaus, 1988]. Met name bij jonge dieren blijkt de groei beïnvloed te worden.

Hierboven werden β -agonisten beschreven als groeibevorderaars, maar eigenlijk is dat niet de juiste benaming. Beta-agonisten werken als herverdelers; zij verschuiven de energiebalans, waarvoor er minder voedsel wordt opgeslagen in de vorm van vet en meer voedsel wordt omgezet in spier (=eiwit). De hoeveelheid vet neemt dus af ten gunste van de hoeveelheid spier. De totale massa neemt echter niet toe, wat wel gebeurt onder invloed van groeihormoon [Yang, 1989].

In figuur 4 staat vereenvoudigd weergegeven op welke wijze β -agonisten (= β -mimetica) de synthese en degradatie van triglycerides (vet) en eiwit (spier) zouden kunnen beïnvloeden.

De anabole effecten van β -agonisten kunnen dus worden onderverdeeld in effecten op spierweefsel, vetweefsel en overige effecten, en zullen in deze volgorde hieronder aan de orde komen.



Figuur 4. Schematisch werkingsmechanisme van β -agonisten op metabole processen.

2.2 Effecten op spierweefsel

Beta-agonisten zijn de meest potente bevorderaars van normale skeletspiergroei. Na slechts 1-2 weken behandeling van ratten met de β -agonist clenbuterol wordt een 10-20% verhoging in spiermassa waargenomen [Reeds, 1986 en Yang, 1989]. Bij lammeren wordt na 2 maanden behandeling met cimaterol zelfs een 25-30% verhoging in

het gewicht van enkele spieren waargenomen. De gastrocnemius-spier zou zelfs 40% toenemen.

De groeirespons is zeer snel waarneembaar, vaak binnen 2 dagen, en is specifiek voor dwarsgestreept spierweefsel. In het hart wordt soms een spiertoename gevonden, maar vaak ook niet, terwijl skeletspieren wel altijd in grootte toenemen. Nooit werd echter een toename gevonden in glad spierweefsel van de darm, de lever en nier [Reeds, 1986]. Mogelijk wordt de eiwit-turnover anders gereguleerd in dwarsgestreept spierweefsel dan in andere weefsels.

Er kan na langdurig β -agonist-gebruik een vermindering van het effect worden waargenomen, mogelijk door downregulatie (vermindering) van β -receptoren. Dit kan echter voorkomen worden door behandeling met tussenpozen (2 dagen wel, dan weer 2 dagen niet).

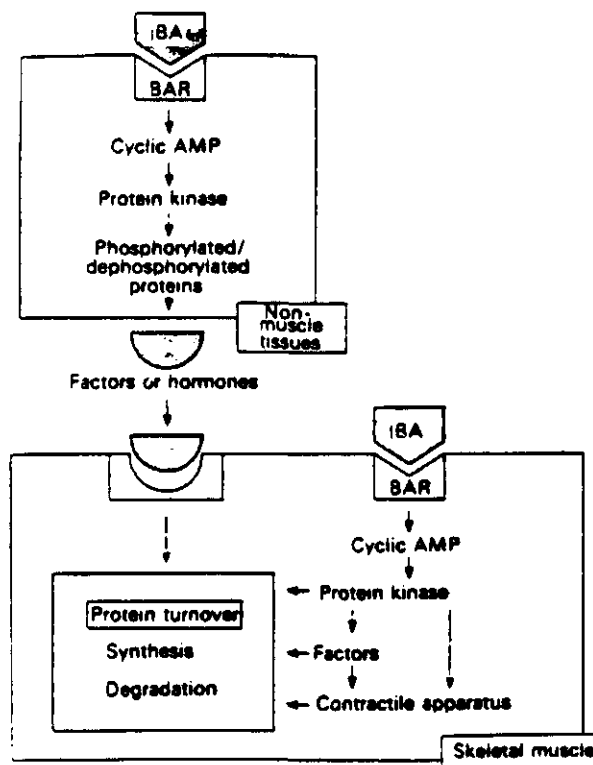
In de spier zijn er 2 typen vezels aanwezig: type I is langzaam contraheerbaar en oxidatief, type II is snel contraheerbaar en gemengd glycolytisch en oxidatief. Uit onderzoek met ratten en lammeren blijkt dat type II-vezels onder invloed van β -agonisten in omvang toenemen. Over type I-vezels zijn er tegenstrijdige berichten [Kim, 1987]. Effecten op vezels en de mogelijke overgang naar een grotere hoeveelheid type II-vezels vinden echter pas plaats na langdurige behandeling met β -agonist. Het belang van dit verschijnsel bij de -snelle- anabole werking van β -agonisten is dus niet geheel duidelijk.

2.3 Mechanisme van de anabole werking op spierweefsel

Een zeer belangrijke vraag die over het werkingsmechanisme gesteld kan worden is de vraag of β -agonisten direct of indirect op de eiwit-turnover werken. Deze vraag kan moeilijk beantwoord worden, aangezien er nog niet zo veel bekend is over de regulatie van intracellulaire eiwit-turnover in spier. In figuur 5 staan de mogelijke werkingsmechanismen van β -agonisten op spierweefsel weergegeven.

β -agonisten kunnen direct aan de β -receptoren op de skeletspier binden en zo uiteindelijk de stimulatie van eiwit-accumulatie bewerkstelligen. Maar β -agonisten zouden ook een β -receptor die niet op een spiercel ligt kunnen activeren, waardoor er allerlei hormonen of andere factoren zouden kunnen worden vrijgezet. Deze factoren zouden dan bij de spier eiwitaccumulatie kunnen induceren.

Beta-agonisten interageren met vele endocriene organen die een rol spelen bij de regulatie van spiergroei. Aangezien dit een te uitgebreid en complex onderwerp is om hier kort te vermelden, zal er in hoofdstuk 5 uitgebreid in worden gegaan op de mogelijkheid van indirecte werking van β -agonisten. Hier dient slechts vermeld te worden dat er uit onderzoek geen gegevens naar voren zijn gekomen die een indirecte werking van β -agonisten aantonen.



Figuur 5. Mogelijke werkingsmechanismen van β -agonisten op spierweefsel.

2.3a Aanwijzingen voor een direct mechanisme: *in vivo*- en *in vitro*-onderzoek

Het vele onderzoek dat er naar de directe werking van β -agonisten is uitgevoerd valt onder te verdelen in *in vitro* en *in vivo*-onderzoek. Voor meer referenties wordt verwezen naar het review-artikel van Yang (1989).

-in vitro-onderzoek

Het *in vitro*-onderzoek is nog niet al te lang geleden gestart en levert nogal wat tegenstrijdige resultaten op. Vandaar dat deze gegevens met grote voorzichtigheid geïnterpreteerd moeten worden. Isoprenaline zou de vrijzetting van glutamine en alanine uit spierweefsel kunnen verminderen, wat op een remming van eiwitdegradatie zou duiden. Isoprenaline zou de eiwitdegradatie ook in geperfuseerde hemicorpus van de rat kunnen remmen. Dibutyryl-cAMP kan eiwitsynthese in vogelspierweefselkweken verhogen, maar alleen als er weinig calcium aanwezig is. Met de stoffen zinterol en cimaterol kan in variërende concentraties geen anabole activiteit in resp. L8- of L6-muisspiercelkweken gevonden worden [McElligott, 1989]. In ratspiercelkweken kan

cimaterol in een concentratie tot 1 μ M eiwitdegradatie remmen, maar weer niet in MM14D-muisspierweefselkweken. De eiwitsynthese blijft onveranderd in beide celsystemen. Cimaterol (1 μ M) heeft een miniem effect op eiwitaccumulatie in embryo-kipspiercelkweken. De hoeveelheid zware keten van myosine wordt echter 25-30% verhoogd.

Clenbuterol remt eiwitdegradatie in skeletspier van de kip, maar niet van de rat. Eiwitsynthese blijft in beide gevallen gelijk. Cimaterol remt eiwitdegradatie in kip-vleugelspier. Aangezien gelijke effecten worden gemeten met en zonder lysosomale remmers, wordt gedacht dat β -agonisten de niet-lysosomale route van eiwitdegradatie remmen. Cimaterol heeft overigens geen effect op eiwitsynthese in deze spier.

Dat er nog veel aan de *in vitro*-modellen gedaan moet worden blijkt uit de tegenstrijdige resultaten uit verscheidene onderzoeken. In tabel 3 op pagina 16 staan de resultaten nog eens weergegeven.

De duidelijke verschillen tussen rat- en kipspier moeten nader worden onderzocht.

De tegenstrijdige resultaten zouden kunnen voortkomen uit het feit dat in een weefselweek een aantal factoren missen. Vermoedelijk is het gebrek aan contraheerbaarheid en de daaruit voortvloeiende metabole veranderingen verantwoordelijk voor dit verschijnsel, aangezien β -agonisten onder meer de contractie beïnvloeden.

-in vivo-onderzoek; meting van synthese.

Emery rapporteert dat dagelijkse injecties met clenbuterol en fenoterol (1 mg/kg) na 6 dagen de spierrmassa verhoogt. Door middel van gelabelde aminozuurfusie wordt bepaald dat eiwitsynthese toeneemt, zonder effect op degradatie [Yang, 1989]. Daarentegen wordt er geen effect op synthese gevonden als clenbuterol (200 μ g/kg) 4-8 dagen aan ratten wordt toegediend, waarbij gebruik wordt gemaakt van dezelfde meetmethode. Geconcludeerd wordt dat de eiwitdegradatie verminderd wordt door clenbuterol [Reeds, 1986]. Mogelijk zijn de resultaten hierboven met elkaar in tegenspraak door verschillen in toediening van de stof, de dosis en de tijd waarop gemeten wordt. In gedenerveerde spier verhoogt clenbuterol eiwitsynthese.

Ractopamine verhoogt spier- α -actine synthese met 50% in varkens na 3 weken. Aangezien de hoeveelheid α -actine-mRNA 2-3maal zo groot wordt, suggereert dit dat β -agonisten eiwitsynthese op pretranslationeel niveau beïnvloeden.

-in vivo-onderzoek; meting van degradatie.

Het is moeilijk om eiwitdegradatie te meten. Een mogelijkheid is het meten van de synthese-snelheid en de hoeveelheid extra geaccumuleerd eiwit daarvan aftrekken. Deze methode is, zeker bij grote dieren, vrij grof.

Een andere methode is het meten van 3-methylhistidine-uitscheiding in de urine. Met deze methode wordt verminderde eiwitdegradatie in jonge kalveren gevonden na β -agonist-behandeling [Williams, 1987].

Met behulp van infusie van gelabeld tyrosine is bepaald dat cimaterol bij kippen na 1

week de degradatie in borst- en beenspier vermindert, terwijl de synthese-snelheid gelijk blijft [Morgan, 1988]. Hetzelfde resultaat wordt gevonden in verscheidene spieren van lammeren behandeld met clenbuterol [Bohorov, 1987]. MacRae (1988) vindt bij lammeren behandeld met clenbuterol ook initiëel eiwitdegradatie, maar sluit niet uit dat later ook een verhoging van de eiwitsynthese zou kunnen optreden.

Al de voorgenoemde gegevens kunnen in tabelvorm worden weergegeven (zie tabel 3). Daaruit blijkt dat er veel aanwijzingen voor een remming van eiwitdegradatie door β -agonisten worden gevonden.

Tabel 3. Gegevens uit onderzoek naar het effect van β -agonisten op eiwit-turnover [gegevens van Yang, 1989].

+ = verhoging, - = vermindering, 0 = geen verandering.

Systeem	synthese	degradatie
<i>in vitro</i>		
Geïsoleerde spier van vogel	0	-
Geïsoleerde spier van rat	0	- / 0
Spierweefselkweek van vogel	+	-
Spierweefselkweek van muis	0	0
Spierweefselkweek van rat	0	- / 0
<i>in vivo</i>		
Vogel	0	-
Rund		-
Lam	0	-
Rat	+ / 0	-
Varken	+	+

Bij eiwitdegradatie zijn proteases betrokken. Beta-agonisten lijken lysosomale protease-activiteit te kunnen verminderen in de spier. Zo blijkt de cathepsine B-activiteit in spierweefsel, maar niet in lever, te zijn verminderd bij lammeren na behandeling met cimaterol of L644,969 [Kretchmar, 1988]. Hetzelfde geldt voor kippen behandeld met cimaterol. Clenbuterol verandert de cathepsine B- en D-activiteit na 1 week niet in EDL- of gastrocnemiusspier, maar wel in de soleusspier van de rat. Na 2 weken vermindert de cathepsine B-activiteit in de EDL- en gastrocnemiusspier, maar neemt toe in de soleusspier. Deze veranderingen in de tijd geven waarschijnlijk de aanpassing van de spier op langdurige β -agonist-behandeling weer.

De niet-lysosomale route is echter ook een belangrijke weg voor normale eiwit-turnover in de spier. In de skeletspier zou het μ M-calciumafhankelijke proteinase een belangrijke

rol bij de eiwitdegradatie kunnen spelen. De activiteit van dit protease vermindert 55-70% in de longissimus dorsi-spier na cimaterol-behandeling, terwijl deze spier 30% in omvang toeneemt [Wang, 1988]. Daarnaast wordt er een 68% verhoging in calpastatine-activiteit (een calcium-geactiveerde proteinase-remmer) waargenomen in de longissimus dorsi-spier van lammeren die 6 weken behandeld zijn met L-644,969 [Kretchmar, 1988]. Ook bij kippen is gevonden dat cimaterol eiwitdegradatie via de niet-lysosomale route remt [Rogers, 1988]. Deze bevindingen tonen aan dat β -agonisten in verscheidene dieren de eiwitdegradatie zou kunnen verminderen, mogelijk via enzym-regulatie.

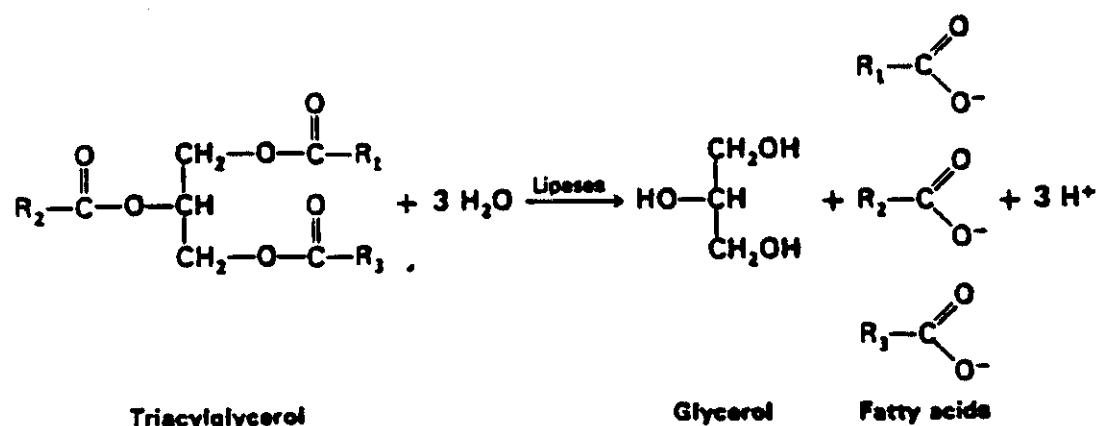
Uit al deze data blijkt dat β -agonisten complexe veranderingen kunnen veroorzaken, die bovendien afhankelijk zijn van de tijd en fysiologische condities. Om het werkingsmechanisme compleet op te helderen is het van belang om een analyse van zowel eiwitsynthese als -degradatie in de tijdsduur te maken.

Belangrijk is ook dat de intracellulaire effecten van β -agonisten anders moeten zijn in skeletspier dan in gladde spier of lever: anders zou in de laatst genoemde ook eiwit-accumulatie moeten optreden.

2.4 Effecten op verweefsel

Vermindering van het lichaamsvet en een verhoogde energieafgifte zijn de meest in het oog springende fysiologische effecten van langdurige β -agonist-behandeling. Het lagere vetgehalte kan veroorzaakt worden door een verhoogde vetmobilisatie uit adipocyten, verminderde vetsynthese in adipocyten en lever, of een combinatie van beide.

Een verhoogde vetmobilisatie uit adipocyten vindt plaats door binding van β -agonist aan de adipocyt- β -receptor, wat via een verhoging van de hoeveelheid cAMP tot de activering van een lipase leidt. Het geactiveerde lipase kan vervolgens triacylglycerol hydrolyseren tot glycerol en vrije vetzuren. Dit proces, ook wel lipolyse genaamd, kan als volgt worden weergegeven (figuur 6 [Stryer, 1987]):



Figuur 6. Lipolyse.

De vetzuursynthese in adipocyten en lever zouden β -agonisten kunnen remmen door

vermindering van enzymactiviteit.

Er zijn grote verschillen gevonden in de regulatie van vetmetabolisme bij vergelijking van diersoorten, zodat het effect van β -agonisten op vetweefsel ook kan variëren. Daarom worden hieronder verscheidene diersoorten apart behandeld. Overigens blijkt het effect van β -agonisten op vetweefsel in verschillende stammen van muizen en ratten nog vrij consistent te zijn, ten opzichte van de variatie die in spiereffecten optreedt [Eisen, 1988].

2.5 Werkingsmechanisme

De lipolytische en anti-lipogene activiteiten van β -agonisten kunnen gemakkelijk direct *in vitro* bepaald worden in adipocyten en hepatocyten. Lipolyse wordt *in vivo* gemeten door de hoeveelheid vrije vetzuren of glycerol in het bloed te bepalen. Lipogenese is echter moeilijker *in vivo* te bepalen: lipogene enzymactiviteit kan hiertoe gemeten worden.

2.5a Knaagdieren

Beta-agonisten verminderen het lichaamsvet in ratten aanzienlijk [Sainz, 1988]. *In vitro* stimuleren β -agonisten lipolyse in adipocyten van de rat, terwijl zij vetzuursynthese in de adipocyten en hepatocyten remmen. Bovendien wordt de proliferatie van preadipocyten door β -agonisten in ratten verminderd. Vetreductie kan dus mogelijk mede bewerkstelligd worden door verandering in het aantal cellen.

Een 4-weekse cimaterol-behandeling verandert de vetzuursynthese bij ratten *in vivo* niet. De β -agonist L640,033 vermindert na 1 week de lipogene enzymactiviteit alleen in de lever. Het lijkt er dus op dat β -agonisten in adipocyten alleen de vermobilisatie verhogen.

Anti-lipogene activiteit lijkt dus *-in vivo-* afwezig; lage concentraties β -agonist verhogen zelfs de vetzuursynthese in aanwezigheid van een fysiologische hoeveelheid aan insuline. Hogere concentraties β -agonisten remmen de lipogenese echter, in aan- of afwezigheid van insuline.

2.5b Zoogdieren gebruikt in de vleesproductie

In schapen, varkens en rundvee verlagen β -agonisten de hoeveelheid vetweefsel [Duquette, 1987]. Bij langdurige behandeling van lammeren met cimaterol worden verhoogde plasmaconcentraties van vrije vetzuren gevonden, wat duidt op een verhoogde vermobilisatie. In schapen wordt de vetzuursynthese echter ook verhoogd door β -agonist-behandeling.

In runderen vermindert de hoeveelheid lichaamsvet na 50 dagen clenbuterol-behandeling [Schiavetta, 1988]. Uit *in vitro*-onderzoek blijkt dat de vetzuursynthese alleen in

subcutaan vetweefsel afneemt, maar niet in intramusculair of perirenaal vetweefsel. Bovendien treedt *in vitro* lipolyse pas op na 48 uur incubatie met clenbuterol [Miller, 1989].

Ook in varkens vermindert de hoeveelheid vet na clenbuterol- en cimaterol-behandeling [Jones, 1985]. Lipolyse kon echter niet worden aangetoond met *in vitro*-onderzoek [Mersmann, 1987]; men stelde daarom voor dat er hier sprake was van een indirect werkingsmechanisme. Recent kon echter wel worden aangetoond dat lipogenese sterk wordt geremd en lipolyse gestimuleerd met dibutyryl-cAMP, adrenaline, ractopamine, isoprenaline en cimaterol. Met gebruik van clenbuterol kon daarentegen geen effect op lipolyse, en tegenstrijdige data omtrent remming van lipogenese gevonden worden. [Mills, 1990 en Peterla, 1990].

Tevens blijken - zowel *in vitro* als *in vivo* - de β -agonisten L644,969 en cimaterol lipolytisch actief te zijn in adipocyten uit varkens [Liu, 1988 en Peterla, 1988]. Er kan dus gesteld worden dat vetmobilisatie het belangrijkste effect van β -agonisten in varkens is. Mogelijk verschilt de selectiviteit van de β -receptor in vetweefsel van varkens ten opzichte van die van andere dieren. Effecten van β -agonisten op hepatisch vetmetabolisme zijn nog niet gerapporteerd. De hepatische vetzuursynthese is echter zeer beperkt in deze dieren.

2.5c Kippen

Beta-agonisten verminderen de hoeveelheid lichaamsvet in kippen nauwelijks. Lipolyse wordt bij kippen, in tegenstelling tot zoogdieren, niet waargenomen. Bij kippen is de lever het belangrijkste orgaan voor vetzuursynthese, en deze blijkt gevoelig voor remming van lipogenese door β -agonisten. Een direct effect op adipocyten lijkt niet op te treden.

Samenvattend kan gezegd worden dat in zoogdieren lipolyse in de adipocyten de belangrijkste manier van vetreductie van β -agonisten is, maar bij kippen mogelijk de anti-lipogenese in de lever.

2.6 Thermogenese

Naast eiwitaccumulatie en vetreductie verhogen β -agonisten ook nog de energie-uitgave van een dier via de 'non-shivering'-thermogenese. Hierbij wordt, in afwezigheid van spierbeweging, de overtollige energie die niet in vetweefsel kan worden opgeslagen omgezet in warmte. Kou en te veel eten kunnen de thermogenese verhogen.

Thermogenese wordt als volgt bewerkstelligd: via lipolyse komen er vetzuren vrij (zie 2.5). Deze vetzuren kunnen vervolgens geoxideerd worden. Normaliter wordt de energie

uit vetzuuroxidatie gebruikt voor 'oxidatieve fosforylering', een proces waarbij ATP gevormd wordt (nodig voor onder andere spiercontractie en signaaltransmissie). Deze oxidatieve fosforylering is via een protongradiënt over de mitochondria (tussen matrix en intermembraan-ruimte [Stryer, 1987]) gekoppeld aan vetzuuroxidatie. Door ontkoppeling van vetzuuroxidatie van de oxidatieve fosforylering wordt de vrijgekomen energie als warmte afgegeven. Hoe deze ontkoppeling wordt bewerkstelligd is alleen in bruin vetweefsel bekend en zal daar nader aan de orde komen.

2.6a Bruin vet

Bij knaagdieren speelt bruin vetweefsel een belangrijke rol bij de thermogenese. Bruin vet is geïnnerveerd door het sympatische zenuwstelsel met noradrenaline als fysiologische effector.

Bruine adipocyten bevatten het eiwit thermogenine in hun mitochondria. Dit eiwit kan protonen naar de mitochondria transporteren zonder koppeling aan ATP-synthese. Warmte-productie kan dus ongelimiteerd plaatsvinden, omdat thermogenine ontkoppeling van de oxidatieve fosforylering veroorzaakt. Thermogenine bezit een inhibitoire purine-nucleotide-bindingsplaats. Binding van GDP aan deze plaats verhoogt de activiteit van thermogenine, zodat de hoeveelheid gebonden GDP als maat kan worden gebruikt voor de thermogene toestand van het bruine vetweefsel.

Acute β -agonist-toediening veroorzaakt een snelle temperatuurstijging in bruin vetweefsel, een verhoogd zuurstofverbruik, en een verhoging of ontmaskering van mitochondriale GDP-bindingsplaatsen. Chronische β -agonist-toediening verhoogt de hoeveelheid eiwit en de celproliferatie van bruin vetweefsel, de concentratie GDP-bindingsplaatsen; kortom de totale thermogene capaciteit van bruin vet in knaagdieren.

De calorigene werking van noradrenaline in bruin vet van de rat kan worden nagebootst met theofylline, dibutyryl-cAMP, en enkele vetzuren. De synchrone stimulatie en remming van lipolyse en thermogenese door respectievelijk noradrenaline en propranolol toont aan dat deze verschijnselen aan elkaar gerelateerd zijn en gemedieerd door β -receptoren. CAMP reguleert de thermogenese indirect, mogelijk door lipolyse te moduleren (blokkeer β -receptoren met propranolol: dan kunnen vetzuren toch calorigene werken) [Bukowiecki, 1981].

2.6b Andere thermogene organen

In vele diersoorten is door adrenergica geïnduceerde thermogenese waargenomen. In knaagdieren is bruin vet de belangrijkste plaats van thermogenese, maar in andere dieren komt er niet of weinig bruin vet voor. Er moeten dus andere organen betrokken zijn bij de thermogenese. Bij de mens en andere dieren wordt gedacht aan betrokkenheid van skeletspier, vanwege zijn grote massa. Bovendien is aangetoond dat β -agonisten de zuurstofconsumptie in skeletspier verhogen. Hoe de thermogene regulatie in dit weefsel

in zijn werk zou gaan is nog onbekend [Jéquier, 1987 en Arch, 1989].

2.7 Andere effecten van β -agonisten

Naast de hierboven genoemde effecten hebben β -agonisten ook nog een scala aan andere effecten, waarvan niet altijd even duidelijk is in welke mate zij betrokken zijn bij de anabole werking van deze stoffen.

In spierweefsel kunnen β -agonisten het calcium-transport beïnvloeden. Calcium is betrokken bij de eiwit-turnover en de contraheerbaarheid van de spier, zodat betrokkenheid bij de anabole werking mogelijk is.

Daarnaast stimuleren β -agonisten de Na/K-pomp-activiteit. De Na/K-pomp is betrokken bij een grote hoeveelheid metabole processen.

De bloedstroom naar de skeletspieren wordt via vasodilatatie door β -agonisten verhoogd. Zo zouden extra factoren voor spiergroei kunnen worden aangevoerd.

Chronische toediening van clenbuterol aan ratten blijkt echter na een initiële verhoging uiteindelijk de bloedstroom in de spier van de achterpoot te verlagen. Gepaard gaande met de verlaging van de bloedstroom in spierweefsel vermindert ook het aantal skeletspier- β -receptoren. De bloedstroom naar vetweefsel blijft echter, zelfs bij chronische behandeling, verhoogd [Rothwell, 1987].

Ook in runderen treedt na behandeling met clenbuterol in eerste instantie een verhoging van de bloedstroom en zuurstofopname op. Binnen enkele dagen vermindert dit effect echter. Aangezien de bloedstroom naar spier slechts tijdelijk verhoogd wordt, lijkt het onwaarschijnlijk dat spiergroei alleen via dit effect gestimuleerd wordt.

Contraheerbaarheid wordt beïnvloed door β -agonisten. Mogelijk bootsen zij een factor na die betrokken is bij de neurale controle van spiergrootte [Maltin, 1989].

Verder kan chronische toediening van β -agonisten anti-hyperglycemisch (glucoseverlagend) werken, mogelijk door stimulatie van insulinesecretie en verhoging van insuline-gevoeligheid. Er is echter geen verband gevonden tussen deze anti-hyperglycemische en de anabole werking van β -agonisten.

2.8 Intracellulaire werking van β -agonisten

Uit het meeste onderzoek blijkt dat verhoogde lipolyse in adipocyten en verlaagde eiwitdegradatie in de spier de belangrijkste werkingen van β -agonisten zijn.

Lipolyse wordt gestimuleerd via de activatie van een lipase (zie 2.4). Eiwitdegradatie wordt gemedieerd door proteolytische enzymen: lysosomaal door cathepsines en cytosolair door enkele andere proteases. Er zijn drie hypothesen gesteld voor de gevonden remming van eiwitdegradatie.

1) Mogelijk vindt eiwitdegradatie plaats via de -gevonden- vermindering van de intracellulaire hoeveelheid Ca^{2+} , aangezien Ca^{2+} enkele proteases kan activeren.

2) Er is een verlaagde hoeveelheid cathepsine B gevonden in met β -agonist behandelde rat, kip en schaap, waardoor er lysosomaal minder eiwitdegradatie kan plaatsvinden [McElligott, 1989 en Morgan, 1987 en Kretchmar, 1988].

3) Een sterkere verhoging wordt echter gevonden van de niet-lysosomale protease-remmer calpastatine. Deze stof remt met name calpain's; zogenaamde calcium-afhankelijke proteases die de niet-lysosomale afbraak van eiwit verzorgen [Waxman, 1981]. De hoeveelheid calpastatine blijkt onder invloed van β -agonisten bij lammeren 2x zo hoog te worden en post-mortem tot 4x zo hoog (na 4 dagen) [Kretchmar, 1990]. Ander onderzoek van met clenbuterol of L644,969 behandelde lammeren wees een tweevoudige verhoging van zowel calpain II (in tegenstelling tot Kretchmar, 1990) als calpastatine uit [Higgins, 1988 en Kretchmar, 1988]. De invloed van een mogelijk verhoogde hoeveelheid calpain II op de eiwitdegradatie in de spier is niet duidelijk. De verhoging van de calpastatine-activiteit zou verantwoordelijk kunnen zijn voor de remming van eiwitdegradatie die β -agonisten in spier veroorzaken.

De calpastatine-antagonist mersalyl kon bij *in vitro*-onderzoek de overall eiwitdegradatie echter niet verminderen [Baracos, 1984]. Of dit resultaat ook verkregen kan worden na β -agonist-stimulatie wordt nu een interessante vraag.

Op dezelfde lammeren is de vleeskwiteit onderzocht. Als malsheidsbepaling voor het vlees werden Warner-Bratzler shear-values gehanteerd. Deze waren bij lammeren met L-644,969 behandeld (4ppm) postmortem (na 3 of 6 dagen) circa 2 maal zo hoog. β -agonisten blijken dus een meetbare invloed op de vleeskwiteit te hebben [Kretchmar, 1990].

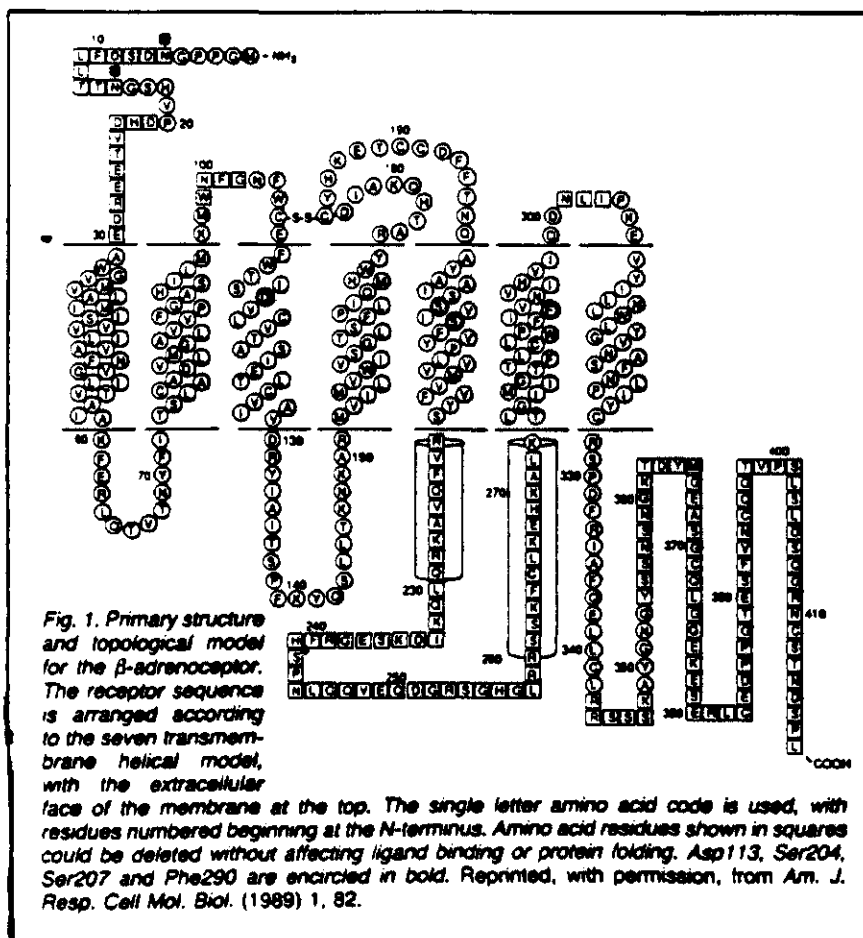
HOOFDSTUK 3: BETA-RECEPTOREN

3.1 Inleiding

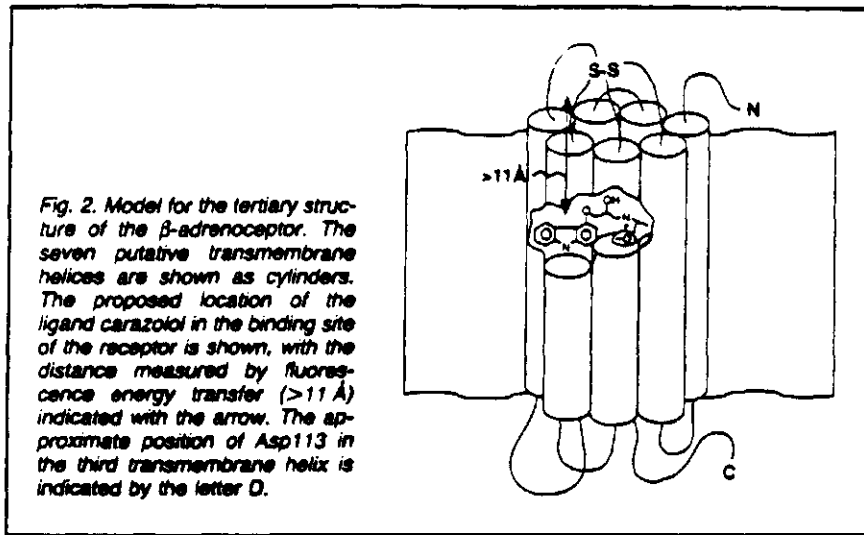
Uit hoofdstuk 2 bleek dat er veel aanwijzingen zijn voor een direct werkingsmechanisme van de β -agonisten op spier- en verweefsel. De binding van deze stoffen aan β -receptoren is de eerste stap in het anabole proces. Waarom en hoe β -agonisten aan deze receptoren binden moet daarom nader worden toegelicht. Allereerst aandacht voor de structuur van de β -receptor.

Biochemisch onderzoek aan de β -receptor heeft een model opgeleverd voor de structuur van deze receptor. Gedacht wordt dat deze receptor zeven hydrofobe transmembrane helixstructuren bezit, met daartussen enkele intra- en extracellulaire loops. In figuur 7 en 8 worden de modellen voor de primaire en tertiaire structuur van de β -receptor weergegeven.

Figuur 7. De primaire structuur en topologisch model van de β -receptor [Tota, 1991].



Figuur 8. De tertiaire structuur van de β -receptor.



3.2 Subtypes β -adrenerge receptoren

Tot voor kort waren β -receptoren alleen onderverdeeld in de subtypes β_1 en β_2 . Ook met bindingsstudies met het aspecifieke ligand ICYP (Iodocyanopindolol) zijn maximaal slechts twee verschillende ligand-bindingsplaatsen in verscheidene weefsels gevonden. Uit functioneel onderzoek met β -agonisten bleek echter dat er meer dan 2 receptor-subtypes in sommige weefsels aanwezig moesten zijn. Een derde zogenaamde 'atypische' β -receptor werd toen geïntroduceerd om de resultaten te verklaren.

Met name in vetcellen heeft men veel onderzoek naar deze receptor verricht. Bij karakterisatie van de atypische β -receptor op vetcellen van de rat werd gevonden dat liganden optimale activiteit vertoonden als zij het aromatische deel van β_2 -agonisten en de alkanolamine-zijketen van β_1 -agonisten bezaten: er werd gedacht aan een 'hybride'-receptor [De Vente, 1980]. Dit werd echter niet altijd gevonden bij niet-catecholamine β -agonisten. In contrast met dit onderzoek hebben bindingsstudies met vier verschillende radioliganden alleen β_1 -receptoren op vetcellen kunnen aantonen [Bahouth, 1988]. De gebruikte hoeveelheden radioligand waren echter te laag ten opzichte van de concentraties benodigd voor lipolyse-remming, zodat atypische receptoren niet konden worden aangetoond. Irreversibele blokkade van de β_1 -receptorpopulatie verhindert de isoprenaline-geïnduceerde adenylaacyclase-activatie niet, wat suggereert dat de functionele vetcelrespons toch via atypische β -receptoren verloopt [Hollenga, 1989].

Onafhankelijk van dit functionele onderzoek is men ook op zoek gegaan naar de DNA-sequenties van de β -receptoren. De β_1 - en β_2 -receptorsequenties van vele dieren waren

Verschillen tussen species blijken eveneens groot te zijn: de humane en hamster- β_2 -receptor bijvoorbeeld hebben totaal een homologie van 88%.

Fig. 1. Amino acid sequences 261 of the human β_1 -AR (1-3) and β_2 -AR (4) have been aligned with that of the human β_2 -AR. In the β_1 - and β_2 -AR sequences, hyphens indicate identity with β_2 -AR. To maximize homologies, deletions represented by empty spaces have been introduced in the three sequences. The seven presumed α -helical membrane-spanning domains (M1 to M7) are highlighted by solid bars and are separated by extracellular (1 to 64) and intracellular (1 to 14) loops. In the NH_2 -terminal region, consensus sequences for asparagine-linked glycosylation sites (NXS/T) are underlined (where X represents any amino acid). * marks every tenth amino acid residue.

			01		M1		i1		
3 ₁			MAPPHNENSSLPAPDLPPLTAPINTANTSGLPGVMEALAGALLAVLATVGGMLVTVAMTPIRLOTWTHAVTSL						79
1 ₁			HGAOVLVGASEPQNLSSAPLPDGAATAAR-LVPASP-ASLIPP-SESEPE-LSQQT-CH-L-M-I--LI-A-V--K--L-L-IN--						100
2 ₁			HCPGNGSAFLTA-NGSHAPDHDTQQRDEWVW-W-IVMB-I---I-F-V--T--KFE--V-Y-I--						75
			<u>M2</u>	<u>o2</u>	<u>M3</u>	<u>i2</u>	<u>M4</u>		
3 ₁			AAADLVMLGLVPPAATIALTGHPMLGATGCELWTSVVLVCTASIEITCALAVDRYLAVTNPRLRYGALVTGRCARTAVVLVWVSAVSPATHSCMR						179
1 ₁			-S-----FG--IVVM-R-EY-SFF-----VI-L-----I-S-F-QS-L-RAR--GL-CT--AI--L--L-LMH--						200
2 ₁			-C-----A--FG-AHI-MOM-TF-NEW--F---I-----VI-----F-I-S-FR-QS-L--NR-VIIDM-I--GLT-L--QNH-Y						175
			<u>o3</u>	<u>M5</u>		<u>i3</u>			
3 ₁			VGADAEAGRCHSNPRCCAFASNPVYLLSSVSFYLPILLVWLYVYARVYVATROLALLAGELGR PPEISPPAPSRSLAPAVGTCAPPE						270
1 ₁			AES--R--YND-K--D-VT-RA-AIA--V--V--CI-A--L--RE-QK-VKIDSCER--LGGPAR--S--P-PV--APPG--RPAAAAATA						299
2 ₁			ATHQ--IN-YA-ET--DEFT-QA-AIA--I---V--VI-V--S--QE-K---QKIDKSE---HVQNL-QVEQ						250
			<u>M6</u>	<u>o4</u>	<u>M7</u>				
3 ₁			QVPACGRPPARLLPLREHRAICTGLINGTETFLWLPFFLANVLRALGQPSLVPGPFAFLANMLGTANSAPNLLYCRSPQFSRFRLLCGRRL						367
1 ₁			PLANGR-CK---S--VA---CK-K--I---V-----VK-FHRE--DRL-VTF-----I-----K-QG---CAR-AA						398
2 ₁			DGRTHGGL--SSKF-C-K-K-K--I-----IV-IVHVIQD--IRKEYIIL--I--V--G-----I--QE---LRSS-						347
			<u>i4</u>						
3 ₁			PPEPCAAARPALFPGVPAARSSPAQPRLCORLDG						402
1 ₁			RRRHATHGDRPRASGCLARP@P-SPGAASDDO-DDVVGATPPARLLEPWAGCNGGAADSSSLDEPCRCGFASESRV						477
2 ₁			AYGNGYSNGNITGEQSGYHVEQEKENK-LCEDLPGTEDFVGHQGTVPSONIDSGRNCSTNDSLL						413

De belangrijkste plaats op de receptor is natuurlijk de ligand-bindingsplaats. Uit onderzoek is naar voren gekomen dat deze zich op enkele hydrofobe transmembrane regio's bevindt. Deze blijken op de 3 β -receptor-genen overigens bijzonder goed geconserveerd. Er is zelfs al gepubliceerd welke aminozuren betrokken zijn bij de binding van de agonisten. In hoofdstuk 4 komen deze aminozuren uitgebreid aan de orde. Buiten de ligand-bindingsplaats bevinden zich nog enkele interessante structuren op de β -receptorDNAsequentie. Zo blijken er onder meer promotors van receptor-eiwitsynthese aanwezig te zijn. Er zijn echter verschillende promotors op de β_2 -receptor

aanwezig, die niet op de β_3 -receptor gevonden kunnen worden: GRE, CRE (glucocorticoid en cAMP Responsive Elements) en de transcriptiefactor Sp1. Het effect van zo'n promotor kan eenvoudig aangetoond worden. Als dexamethason (een glucocorticoïde) aan een vetcel wordt toegevoegd tijdens zijn differentiatieperiode, wordt er 40x zo veel β_2 -receptor geproduceerd, terwijl normaal voornamelijk β_1 - en β_3 -receptor worden geproduceerd. Er zijn overigens geen negatieve GRE op de β_3 -receptor gevonden.

Verder bezitten de β_2 - en β_3 -receptor respectievelijk 2 en 6 FSE's (Fat Specific Elements: vetcel factoren) die mogelijk ook de expressie van β -receptoren beïnvloeden. Over de β_1 -receptor is hier nog niet zo veel van bekend [Emorine, 1991].

3.4 Desensitisatie

Door continue stimulatie met β -agonist kunnen de β_1 - en β_2 -receptor gedesensitiseerd raken; een speciaal kinase (BARK) fosforyleert de receptoren dan, waardoor ze minder gevoelig zijn voor activatie. De β_3 -receptor bevat op het C-terminale deel van het gen weinig serine- en threonine-residuen, zodat fosforylatie nauwelijks mogelijk is. De β_3 -receptor zou dus nauwelijks gedesensitiseerd raken, maar functioneel onderzoek is daar nog niet aan gedaan.

Door β -agonisten met tussenpozen te geven wordt desensitisatie voorkomen (zie hoofdstuk 2). Er zijn ook berichten verschenen dat de β -agonist salmeterol nauwelijks desensitisatie geeft. Verder kunnen glucocorticoïden desensitisatie voorkomen of omkeren (zie hoofdstuk 5).

3.5 Localisatie van subtypes β -adrenerge receptoren

Een belangrijke vraag die nu gesteld kan worden is: waar bevinden zich nu welke subtypen receptoren? In de inleiding is al schematisch weergegeven waar men dacht dat de β_1 - en β_2 -receptor aanwezig waren (1.4). De introductie van de atypische en β_3 -receptor maakt het noodzakelijk dat er een reevaluatie van deze gegevens plaatsvindt.

Een eenvoudige manier om te bepalen of dezelfde receptoren op verschillende organen aanwezig zijn is functioneel onderzoek. Hierbij worden een aantal β -agonisten getest op hun potentie (contractie en relaxatie wordt hiertoe op de organen gemeten). Als de agonisten eenzelfde potentievolgorde op verschillende weefsels laten zien, kan dit er op wijzen dat eenzelfde receptor bij de werking betrokken is (op dezelfde wijze heeft Lands een onderverdeling in β_1 - en β_2 -receptoren gemaakt, zie 1.4).

In tabel 4 staan de potentievolgorde en pD_2 -waarden (= $-\log(\text{dissociatieconstante})$) van enkele β -agonisten op verscheidene systemen weergegeven. De bovenste drie systemen zijn redelijk goed gekarakteriseerd. Duidelijk blijkt dat de potentievolgordes op de trachea en uterus niet verschillen, behalve bij prenalterol. Deze systemen, als β_2

gekaracteriseerd, verschillen van het bovenste systeem: de hartreceptoren, die altijd als β_1 zijn gekenschetst. Als nu de witte vetcellen van de rat met de andere systemen wordt vergeleken, blijkt dat opeens de BRL-serie agonisten zeer potent wordt. De witte vetcellen bevatten dus mogelijk een atypisch receptorsysteem.

Nu is van de mens een ' β_3 -receptor' gecloneerd. Deze is in CHO-cellen tot expressie gebracht en ook op deze cellen kon functioneel onderzoek worden verricht. De vraag is of de atypische receptoren die gevonden waren op vetcellen overeenkomen met deze β_3 -receptor. Uit de potentievolgorde op de β_3 -receptor blijkt dat ook hier de BRL-serie agonisten zeer potent zijn. Dit in tegenstelling met de (humane) β_1 - en β_2 -receptor. Als deze in CHO-cellen tot expressie worden gebracht blijkt BRL37344 in β_1 - niet actief, en in β_2 - minder actief te zijn dan in de β_3 -receptor.

Tabel 4. Potentievolgorde van enkele β -agonisten op verscheidene weefsels [gegevens van Wilson, 1984 en Emorine, 1989].

Systeem:	Potentievolgorde (pD ₂ -waarde):
Atrium van rat(β_1) ⁰	Iso(8.9)>Pren*(7.5)≥Fen(7.3)≥BRL35135*(7.3)>Sal(6.0)>BRL28410*(4.1),35113*
Trachea van cavia(β_2)	Iso(8.6)>Fen(8.5)>Sal(7.6)>BRL35135*(7.5)>Pren*>BRL28410(4.7)≥BRL351313*(4.7)
Uterus van rat(β_2)	Iso(8.5)>Fen(7.8)>Sal(7.6)>BRL35135*>BRL28410(5.0)>BRL35113(4.9)>Pren
Wit vet van rat [#]	Iso(7.9)>BRL35135*(7.8)>Fen(6.3)>BRL35113*(6.1)>BRL28410*(5.4)>Sal*(4.9)>Pren*
B ₃ -cloon van mens [^]	Iso(8.4)>BRL37344(8.2)>Fen(7.6)>Sal*(6.6)>Pren*(6.3)>BRL28410*(5.6)

Iso = Isoprenaline, Pren = Prenalterol, Fen = Fenoterol, Sal = Salbutamol.

⁰ = Stimulatie van snelheid; stimulatie van spanning geeft vergelijkbare waarden.

* = partiële agonist.

= potentie werd bepaald via de lipolyse.

[^] = potentie werd bepaald in CHO-cellen via cAMP-productie.

Tabel 4 geeft dus enige aanwijzingen voor atypische receptorsystemen op vetcellen en een 'atypische' β_3 -receptor. De potentievolgorde is echter niet helemaal identiek tussen de atypische vetcel- en β_3 -receptor. Verder functioneel onderzoek toont nog meer verschillen aan:

- Alprenolol en practolol remmen de cAMP-productie van de CHO- β_3 -cellen, terwijl ze op de atypische vetcel-receptor antilipolytisch werken.
- Het ligand ICYP bindt wel aan de β_3 -, niet aan de atypische vetcel-receptor.
- Meer potentieverschillen bij gebruik van andere β -agonisten (tabel 5):

Tabel 5. Potentievogorde en pD₂-waarden van enkele β -agonisten op mogelijk 'atypische receptorsystemen' [Zaagsma, 1990].

Systeem:	Potentievogorde (pD ₂ -waarde):
CHO- β_3 -receptor*	Iso(8.4) > BRL37344(8.2) $\geq$ Nor(8.2) > Fen(7.6) > Adr(7.3) > Sal(6.6)
humaan wit ver ^o	Iso(7.6) > Fen(6.5) > Adr(6.3) > Nor(6.2) > BRL37344(5.5) $\geq$ Sal(5.5)
wit vet van rat ^o	BRL37344(8.7) > Iso(7.6) > Fen(7.0) $\geq$ Nor(6.9) > Adr(6.8) > Sal(5.8)

Iso = Isoprenaline, Nor = Noradrenaline, Fen = Fenoterol, Adr = Adrenaline, Sal = Salbutamol.

* = cAMP-meting, ^o = lipolyse-meting.

Er zijn dus duidelijk verschillen tussen de atypische vetcel- en β_3 -receptor. Mogelijk duidt dit op het bestaan van meerdere 'atypische' β -receptoren of op verschillen tussen species: verder onderzoek zal hierover uitsluitel moeten bieden.

3.5a Verschillen tussen species

Niet alleen bestaan er mogelijk meerdere 'atypische' β -receptoren in weefsels binnen één organisme, ook bij vergelijking van weefsels van verscheidene species zijn er verschillende β -receptorsystemen aangetoond. Dit blijkt onder meer als verscheidene vetcellen worden vergeleken.

In alle species zijn β_1 - en β_2 -receptoren aanwezig, maar de hoeveelheden verschillen aanzienlijk. Zo zou in de hond de lipolyse in vetcellen via β_1 - en β_2 -receptoren kunnen verlopen; er treedt remming op van noradrenaline- en salbutamol-geïnduceerde lipolyse met respectievelijk β_1 - en β_2 -antagonisten. Vergelijkbare resultaten zijn voor de hamster gevonden. Er zijn echter ook aanwijzingen voor een populatie atypische β -receptoren in dit dier, aangezien de antagonistische activiteit op lipolyse relatief laag ligt. De lipolyse in het varken daarentegen vertoont farmacologisch gezien alle karakteristieken voor atypische receptor-regulatie. Zowel voor de rat als voor de mens zijn er aanwijzingen gevonden voor de aanwezigheid van zowel β_1 -, β_2 - en atypische receptoren op de vetcellen [Zaagsma, 1990].

Een recent farmacologisch onderzoek op witte vetcellen van verscheidene species (via lipolyse-meting en bindingsstudies) toont echter totaal andere resultaten: zowel de rat als hamster, konijn, en de hond bleken zeker drie verschillende β -receptoren op hun witte vetcellen te bezitten. Voor de mens konden er echter maar twee β -receptoren worden aangetoond [Langin, 1991]: lipolyse kon niet of nauwelijks worden opgewekt in humane vetcellen met BRL- en PEAT-derivaten, in tegenstelling tot andere onderzoeken (zie o.a. 3.5b).

3.5b Onderzoek met nieuwe β -agonisten

Uit bovenstaand functioneel onderzoek blijkt dat de recent ontwikkelde BRL-stoffen mogelijk specifiek zijn voor atypische receptoren (zie tabel 4 en 5).

Duidelijk toont de BRL-serie agonisten een aanzienlijk hogere potentie op de atypische vetcel- en β_3 -receptoren (voor structuur van deze stoffen, zie hoofdstuk 4). Veel aandacht is er aan deze stoffen besteed als mogelijke afslankmiddelen, aangezien via de atypische β -receptoren op vetcellen de thermogenese verhoogd kan worden, terwijl er minder energie in de vorm van vet wordt opgeslagen. Dat de BRL-serie specifiek op lipolyse in vetcellen werkt blijkt wel uit de volgende tabel, waarin de selectiviteit van enkele β -agonisten ten opzichte van verschillende receptorsystemen wordt vergeleken [Timmerman, 1987]:

Compound	EC ₅₀ atria or trachea / EC ₅₀ lipolysis	
	EC ₅₀ -iso* atria or trachea / EC ₅₀ -iso* lipolysis	
	atria	trachea
isoprenaline	1	1
fenoterol	0.91	0.038
prenalterol	0.036	0.42
BRL 28410	112	30
BRL 35113	160	121
BRL 35135	33	7.1

* iso = isoprenaline

Tabel 6. Selectiviteit van enkele β -agonisten voor verschillende β -receptoren.

De hierboven niet vermelde agonist BRL37344 bleek de meest potente stof in de BRL-serie te zijn [geïntroduceerd door Arch, 1984, zie hoofdstuk 4, en Langin, 1991]. Deze stof is respectievelijk 400- en 200maal zo selectief voor lipolyse (in bruin vet van de rat) ten opzichte van de atriale β_1 - en tracheale β_2 -respons. De lipolytische potentie van BRL37344 in bruin vet is 6maal hoger dan die van isoprenaline, en in wit vet zelfs 10maal hoger [Hollenga, 1989].

In ratten bleek de nieuwe β -agonist ICI D7114 selectief bruin vet te stimuleren en het totale zuurstof-verbruik te verhogen (via thermogenese) [Holloway, 1991]. Deze stof bleek geen effecten op hartfunctie te hebben in tegenstelling tot stoffen als isoprenaline en clenbuterol (structuur: hoofdstuk 4).

Onderzoek met behulp van bovengenoemde stoffen heeft ook nieuwe informatie opgeleverd omtrent de aanwezigheid van atypische receptoren op andere organen. Naast atypische β -receptoren op vetcellen werd hun aanwezigheid ook vermoed in de maag,

ileum en colon in het gladde spierweefsel. Onderzoek waarbij hybridisatie van mRNA van de β_3 -cloon met weefsels werd toegepast leverde als bindingsplaatsen: vetcellen, lever, soleusspier, ileum en niet: hersenen, huid, hart en long (in tegenstelling tot enkele farmacologische onderzoeken, zie beneden).

Er wordt nu zelfs gedacht dat adipocyten β_1 -, β_2 -, en β_3 -receptoren zouden bevatten, die dezelfde functie mediëren afhankelijk van de stimulatiecondities. Een aanwijzing hiervoor geeft onderzoek waarbij een verschillende relatie tussen cAMP en lipolyse is gevonden voor BRL37344 en isoprenaline in vetcellen van de rat (waarbij isoprenaline mogelijk voor een klein deel via β_1 -receptoren actief is) [Holloway, 1991].

In soleusspier bleken BRL-agonisten ook zeer actief. Skeletspieren zijn echter altijd gekarakteriseerd als β_2 -systemen. Gedacht wordt dat er op skeletspier naast een grote hoeveelheid β_2 -receptoren toch ook een hoeveelheid atypische receptoren aanwezig is.

Uit functioneel onderzoek blijkt de potentievolgorde op soleusspier toch niet helemaal gelijk aan die op adipocyten. Men kan daaruit concluderen dat de receptorpopulaties op deze twee systemen verschillen. Of de aanwezige atypische receptoren ook van elkaar verschillen is nog niet duidelijk.

Met behulp van de β_1 - en β_2 -antagonist (blokker) propranolol zijn enkele interessante gegevens aan het licht gekomen. Men heeft deze stof als blokker toegepast op verscheidene organen, na stimulatie met BRL28410. De inhibitoire activiteit (uitgedrukt als de $-\log(\text{dissociatieconstante}) = pA_2$) van propranolol bleek op de organen sterk uiteen te lopen, zie tabel 7 [data van Challiss 1988].

Tabel 7. De remming van BRL28410-gemedieerde effecten door propranolol op verscheidene weefsels.

Systeem	pA_2 (= $-\log(\text{dissociatieconstante})$ van propranolol)
Skeletspier	7.6
Atria (β_1)	8.4
Trachea (β_2)	8.7
Bruin vet	6.2
Wit vet	6.8

Duidelijk blijkt dat propranolol de effecten van de β -agonist BRL28410 op de atria en trachea zeer goed remt. Op vetweefsel echter blijkt propranolol een factor 100 lagere affiniteit te bezitten. Op skeletspier heeft propranolol een intermediaire werking. Mogelijk duidt dit onderzoek op de aanwezigheid van atypische β -receptoren op vetweefsel en een heterogene groep β -receptoren op de skeletspier. (Overigens denkt Challiss zelf mogelijk een subtype van de β_2 -receptor op de soleusspier te hebben

ontdekt.) Er bestaan echter enkele tegenstrijdige onderzoeksresultaten omtrent de slechte werkzaamheid van propranolol op atypische receptorsystemen, met name op spierweefsel [Blum, 1988: remming met propranolol, Chaliss, 1988 en Wilson, 1984: verminderde remming]. Nader onderzoek met antagonisten lijkt wenselijk.

Interessante resultaten met β -antagonisten zijn wel al op vetweefsel gevonden. Bij gebruik van de β_1 -antagonist CGP20712A (tot 10 μ M) blijkt geen remming van BRL37344-geïnduceerde lipolyse in vet van de rat op te treden. Als echter de β_2 -antagonist ICI118.551 gebruikt wordt, kan wel remming van de lipolyse gevonden worden [Hollenga, 1991].

Naast bovengenoemd onderzoek op vet- en spierweefsel levert functioneel onderzoek aan andere weefsels ook interessante data over atypische β -receptorsystemen. Zo blijkt de potentievolgorde van enkele β -agonisten op de darmen van de rat ook op een atypische receptorpopulatie te wijzen:

BRL37344 > Iso > Nor > Adr > Fen (vergelijk met tabel 5)

Bovendien blijkt propranolol ook op darmen β -adrenerge stimulatie minder goed te antagoniseren [Bond, 1988].

Aanwijzingen voor aanwezigheid van atypische receptorpopulaties zijn ook gevonden in maag [McLaughlin, 1991], hart en longen [Kaumann, 1989].

Recent is de PEAT-serie (phenylethanolaminotetralines, zie hoofdstuk 4) bekend geworden als een groep selectieve agonisten voor atypische β -receptoren [op darm: Manara, 1990 en Bianchetti, 1990]. Mogelijk biedt deze groep naast het gebruik van de BRL-serie en β -antagonisten perspectieven voor verder onderzoek op vet- en spierweefsel.

HOOFDSTUK 4: RECEPTOR-BINDING VAN BETA-AGONISTEN

In de inleiding is al schematisch aangegeven dat β -agonisten β -receptoren stimuleren, zodat via een verhoogde concentratie cAMP het uiteindelijke effect wordt bewerkstelligd. In dit hoofdstuk zal nader in worden gegaan op het exacte werkingsmechanisme van β -agonisten op receptorniveau. Voor een beter begrip zal eerst nader worden ingegaan op het mechanisme van receptoractivatie. Daarna zullen de verschillende klassen β -agonisten en hun uiteenlopende interacties met β -receptoren aan de orde komen.

4.1 Receptoractivatie

Wat er precies bij receptoractivatie gebeurt is niet duidelijk. Wel is er een model opgesteld aan de hand van de β_2 -receptor om de gebeurtenissen te kunnen verklaren. De β -receptor bevindt zich eerst in de grondtoestand (R^0), totdat er binding met bijvoorbeeld adrenaline (Ad) optreedt, waardoor een conformatieverandering in het receptormolecuul optreedt. Er ontstaat nu een geactiveerd adrenaline-receptor-complex (AdR^{Ad} ; zie figuur 10).

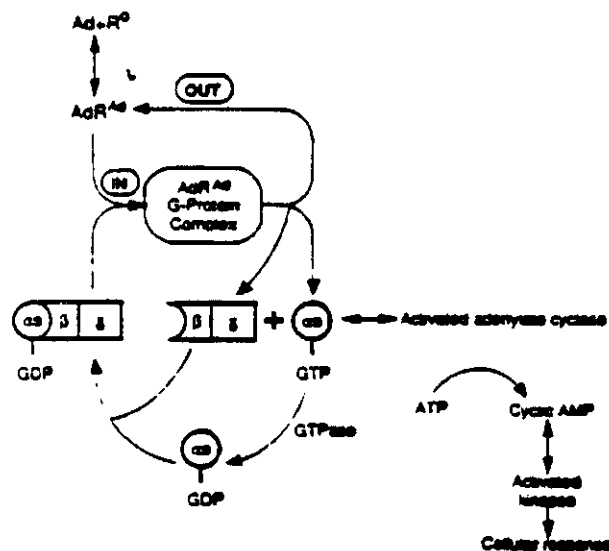


Figure 1 Diagram showing how adrenaline (Ad) reacts with the β -adrenoceptor protein (R^0) to form the activated enzyme (AdR^{Ad}) which catalyses the formation of α -GTP from a trimeric G protein ($\alpha \beta \gamma$). α -GTP activates GDP adenylyl cyclase and the cellular response is continued. The effect of adrenaline ceases when AdR^{Ad} dissociates and that of α -GTP when it disengages from its receptors and/or is hydrolysed to α -GDP because of its intrinsic GTPase activity. While they exist each AdR^{Ad} complex and each α -GTP-cyclase complex process a number of their substrate molecules and so low concentrations of extracellular adrenaline give rise to higher concentrations of cyclic-AMP inside the cell.

Figuur 10. Diagram van receptoractivatie.

Dit geactiveerde complex catalyseert de dissociatie van het driedelige G_s -eiwit in een α_s -GTP-deel (gevormd uit het α_s -GDP-deel door uitwisseling van GDP voor GTP) en een $\beta\gamma$ -deel. Het geactiveerde complex blijft bij deze reactie onveranderd. Vervolgens kan het α_s -GTP-deel adenylaacyclase activeren, dat dan cAMP uit ATP vormt, zodat via activering van kinases een cellulaire respons optreedt.

Belangrijk is om hierbij op te merken dat elk AdRA_d-complex en elk α_s -GTP-cyclasecomplex een aantal substraten kan verwerken alvorens dissociatie optreedt, waardoor een versterking van de reactie optreedt (cascade-effect). Zo kan een zeer kleine hoeveelheid adrenaline al zeer hoge concentraties cAMP in de cel veroorzaken.

De biologische activiteit van adrenaline wordt bepaald door zijn capaciteit tot α_s -GTP-vorming. De vorming van dit molecuul is echter weer afhankelijk van de benodigde tijd voor G-binding en -verwerking (efficiëntie; catalytische activiteit), en van de stabiliteit van het AdRA_r-complex (bepaalt de hoeveelheid gecatalyseerde G-eiwitten per complex).

4.2 Bepaling van de potentie van β -agonisten (op β_2 -systeem)

Uit de vorige paragraaf bleek dat de potentie van β -agonisten afhankelijk is van de stabiliteit van complexvorming met de β -receptor en/of de catalytische activiteit van het complex.

In de praktijk zijn potente agonisten op β_2 -receptoren ontdekt, door een grote, apolaire substituent aan de N-zijketen te plaatsen. Klaarblijkelijk levert dit extra interactiepunten met de flexibele receptor op, zodat er grotere stabiliteit wordt verkregen.

De potentie van β -agonisten bleek goed te correleren met hun affiniteit voor β_1 - en β_2 -receptoren (bij gelijkwaardige catalytische activiteit van de agonisten). Zo zijn er vele β -agonisten ontdekt die stabielere complexen met de β -receptor vormen dan adrenaline. Complexen met een hogere catalytische activiteit dan het adrenaline-receptor-complex zijn echter vrijwel nooit gevonden.

4.3 Selectiviteit in werking van β -agonisten

Selectiviteit in werking kan bereikt worden door een hoge affiniteit van de β -agonist voor een bepaald subtype β -receptor. Ook kan de catalytische activiteit van een β -agonist hoger zijn op het ene subtype β -receptor ten opzichte van het andere.

Salbutamol bijvoorbeeld is veel actiever op de trachea (β_2) dan op het hart (β_1). Het potentieverschil is zeker 500, terwijl het affiniteitsverschil slechts 3 bedraagt. De selectiviteit van salbutamol wordt waarschijnlijk dus veroorzaakt door zijn grotere catalytische activiteit op β_2 -receptoren. Dit blijkt veelal op te gaan voor zeer selectieve niet-catechol β_2 -agonisten, aangezien het hoogste affiniteitsverschil niet boven de 25 uitkomt (voor $\beta_2:\beta_1$).

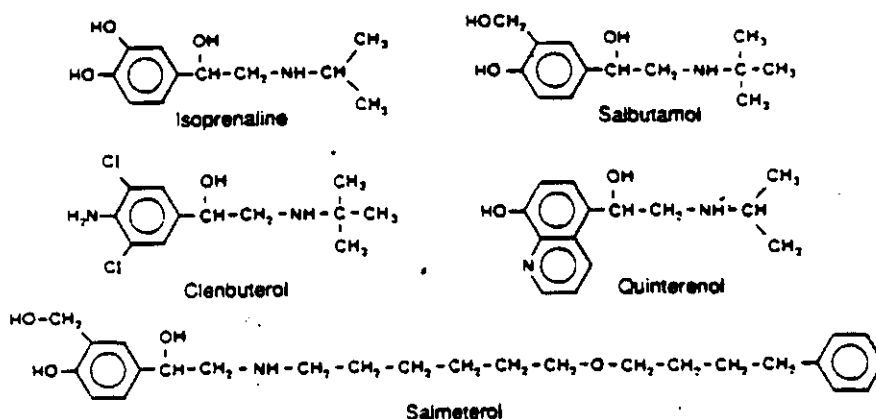
4.4 Verschillende soorten interacties van onnatuurlijke β -agonisten met de β_2 -receptor

Jack (1991) heeft onderzoek gedaan naar de werking van vele β -agonisten op de β_2 -receptoren op gesuperfundeerde trachea (luchtpijp) van cavia's. Daarbij heeft hij de begin- en eindtijd van de werking van deze stoffen bepaald, aangevuld met bindingsstudies op longweefsel van de rat om de affiniteit en dissociatietijd van de β -agonisten te bepalen (zie tabel 8). De bijbehorende structuren staan weergegeven in figuur 11.

Agonist	Relative equipotent concentration (EC_{50}) (- isoprenaline = 1)	Onset time (OT_{50} min)	Recovery time (RT_{50} min)	n	Rat lung β_2 -adrenoceptors Relative affinity (- isoprenaline = 1)	Time for 50% dissociation (min)
(-) Isoprenaline	1 ($pEC_{50} \sim 7.7$)	$> 1 < 3$	$> 2 < 4$	25	1 ($pK_i \sim 6.7$)	≤ 4
($\pm$) Salbutamol	3.0	3.2 (2.0-5.4)	11 (8-15)	8	10	≤ 4
($\pm$) Clenbuterol	0.6	6.7 (4.5-8.9)	48 (39-57)	6	0.28	≤ 4
($\pm$) Salmeterol	0.4	29 (24-36)	No recovery	14	0.07	> 150 in effect =
($\pm$) Quinterenol	27	About 5	No recovery*	2	43	$> 4 < 10$
$[^{125}I]$ -(-) Iodopindolol	-	-	-	-	-	Time for 50% association ~ 4

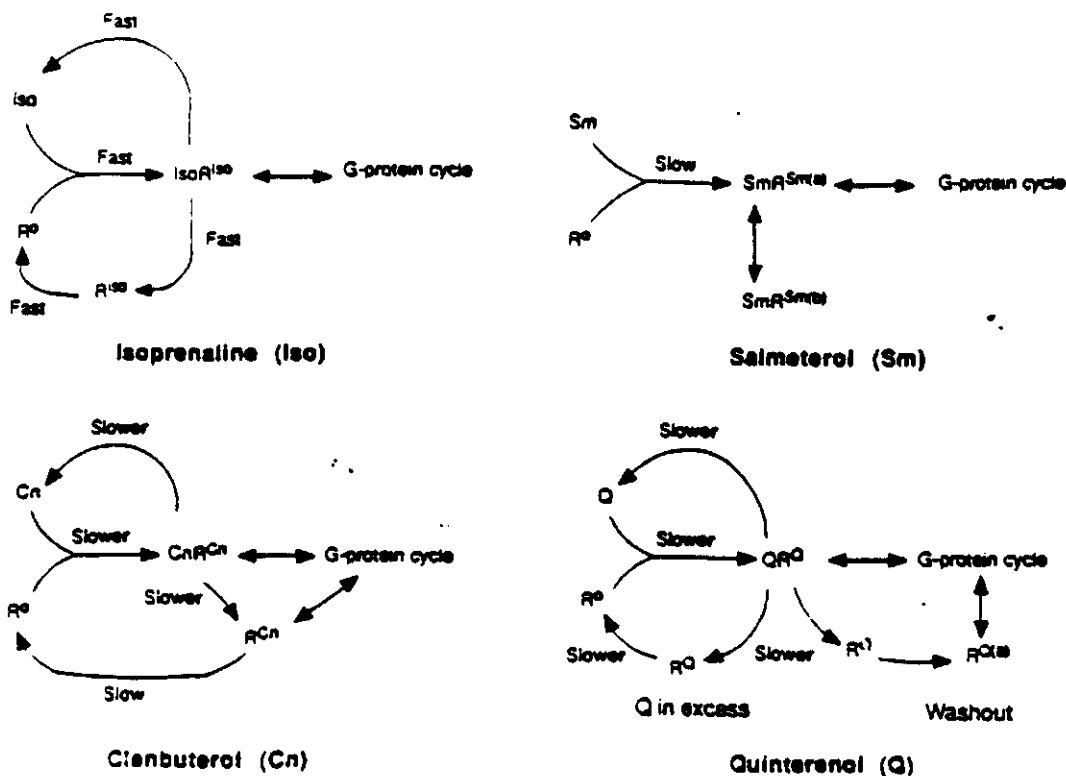
* Submaximal responses intensity during drug washout.

Tabel 8. Karakteristieken van de werking van enkele β -agonisten op gesuperfundeerde longspier van de cavia en op longmembranen van de rat.



Figuur 11. Structuren van de onderzochte β -agonisten uit tabel 8.

Uit deze gegevens heeft Jack enkele fraaie modellen voor de interactie van enkele β -agonisten met de β_2 -receptor opgesteld (zie figuur 12).



Figuur 12. Diagrammen met de verschillende soorten interacties van enkele β -agonisten met de β_2 -receptor (R^0). Bij $SmR^{Sm(a)}$ bezet het phentolamine deel van salmeterol de β_2 -receptor. Bij $SmR^{Sm(b)}$ is de receptor niet bezet. $R^Q(a)$ is een permanent geactiveerde vorm van de receptor.

Allereerst zijn isoprenaline en salbutamol onderzocht. Aangezien hun affiniteit voor de β_2 -receptor laag is, werd verwacht dat de begin- en eindtijd van de werking zeer kort waren. Bij isoprenaline blijkt dit te kloppen. Salbutamol heeft een enigszins langzamere begintijd van werking, maar deze stof heeft ook een wat lagere catalytische activiteit. Wat niet verwacht werd was de langere eindtijd van werking, aangezien de dissociatietijd van beide stoffen ongeveer gelijk was. Een verklaring hiervoor wordt gevonden bij onderzoek met clenbuterol. Deze stof bezit een lage catalytische activiteit, maar een hoge affiniteit. Er wordt dan ook een lange begin- en eindtijd van werking gevonden. De dissociatietijd van clenbuterol blijkt echter gelijk te zijn aan die van isoprenaline, welke te snel is om de langzame eindtijd te verklaren. Jack meent dat de lange werking veroorzaakt wordt doordat de receptor catalytisch actief blijft na dissociatie van de agonist.

Salmeterol wordt geacht een 'captieve agonist' te zijn: deze stof associëert langzaam met de receptor en dissocieert er niet meer van. Het agonist-receptor-complex alterneert echter tussen een actieve en inactieve vorm. De lange werkzaamheid van salmeterol wordt veroorzaakt door de lange N-zijketen. Hydrofobe interacties binden de stof irreversibel aan de receptor.

Een laatste soort interactie met de β -receptor wordt besproken aan de hand van quinterenol. Deze stof associëert langzaam met de receptor en werkt dan langdurig. Er zijn echter twee verschillen gevonden met de werking van salmeterol: bij uitwassen van quinterenol neemt de activiteit van de stof toe, en de stof dissocieert snel van de receptor. Na uitwassen van de agonist ontstaat er klaarblijkelijk een zichzelf activerende receptor. Op deze wijze kan verklaard worden waarom sommige β -agonisten zich farmacologisch zo verschillend gedragen.

4.5 Structuur van β -agonisten

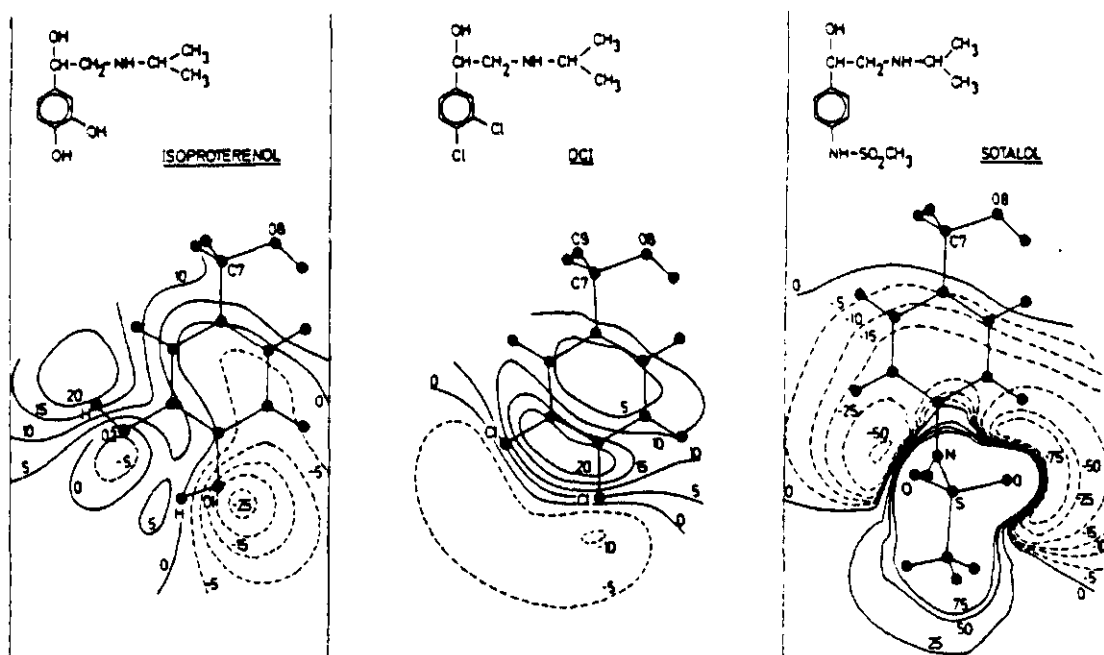
Een uitgebreid onderzoek naar de structuur-activiteitsrelaties van β_2 -agonisten is reeds in 1978 uitgevoerd [Bilezikian]. Nu er steeds meer β -agonisten bekend worden lijken de overeenkomsten steeds geringer te zijn. Bij het bestuderen van de verschillende klassen β -agonisten blijkt de enige gemeenschappelijke structuur de R_1 -COH-C-N- R_2 -unit te zijn [Gustin, 1989; zie structuren in hoofdstuk 1].

Daarbij geeft een grote apolaire groep op de N extra stabiliteit. Met gebruik van QSAR-onderzoek is bepaald welke eigenschappen van belang zijn voor de potentie (catalytische activiteit) en welke voor de affiniteit van een β -agonist voor de receptor [Dove, 1991].

De potentie wordt beïnvloed door elektronische interacties (onder meer ladingsoverdracht tussen H-bindingen van phenyl). Voor affiniteit zijn hydrofobe en mogelijk ook sterische interacties van belang (onder meer groepen op de N-keten). Bij beiden is de β -OH-groep van belang. Door groepen op de catechol-OH's te zetten, wordt afbraak door MAO en COMT voorkomen (zie hoofdstuk 1).

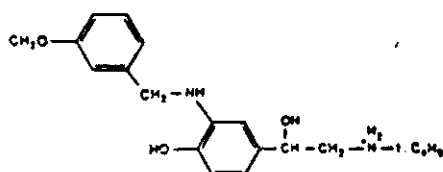
Opmerkelijk is de goede werking van clenbuterol. In tegenstelling tot de andere β -agonisten bezit deze stof geen enkele catechol-OH groep. Algemeen wordt verondersteld dat deze OH-groepen via H-bruggen met de receptor voor extra stabiliteit zorgen, en absoluut noodzakelijk zijn voor activiteit. Een mogelijkheid zou kunnen zijn dat de grote electronendichtheid die clenbuterol bezit zijn -mechanistisch andere- activiteit kan verklaren.

SAR-onderzoek (structuur-activiteits-relaties) met de agonist isoprenaline, de partiële agonist DCI en de antagonist sotalol heeft aangetoond dat de electronendichtheid op de aromaatgroep inderdaad van groot belang is [Miklavc, 1990]. Zoals uit figuur 13 blijkt zijn bovengenoemde stoffen aan elkaar gelijk op de 3- en 4-aromaatgroepen na. De 3- en 4-OH-groepen van isoprenaline vormen een bindingsplaats met sterk negatieve electrostatische potentiaal. De 3- en 4-Cl-groepen van DCI zorgen voor een zwak negatieve potentiaal, terwijl de 4-groep van sotalol helemaal geen negatieve potentiaal veroorzaakt, zodat er slechts zwakke binding optreedt.



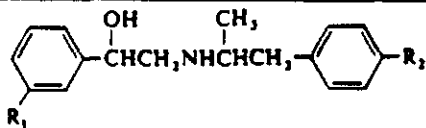
Figuur 13. Electrostatistische potentiaal-'kaarten' van de β -agonist isoprenaline, de partiële agonist DCI, en de antagonist sotalol berekend op 1.7 Å boven het vlak van de aromatische ring. Gebroken lijn betekent een negatieve, gewone lijn een positieve potentiaal (Unit = 0.627kcal/mol) [Miklavc, 1990].

Andere opmerkelijke β_2 -agonisten zijn bijvoorbeeld salmeterol en QH25. Salmeterol is hiervoor al genoemd (zie figuur 11). De extra lange werking van deze stof zou veroorzaakt worden doordat de lange zijketen van deze stof aan extra bindingsplaatsen buiten de β -receptor op het membraan bindt ('exo-sites'). QH25 is een recent gevonden stof die 12 maal zo actief bleek als salbutamol bij gebruik in astma; deze bezit een zeer grote 3-groep op het aromaatdeel (zie figuur 14).



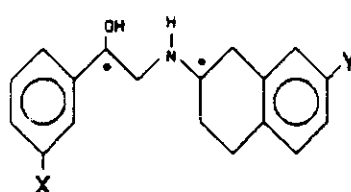
Figuur 14. QH25

Volkomen andere structuren bleken de β -agonisten te bezitten die specifiek op lipolyse in vetcellen werken (via atypische receptoren). er zijn twee belangrijke klassen gevonden (zie ook hoofdstuk 3): de BRL-serie [Arch, 1984] en de PEAT-serie [Bianchetti, 1990]. Belangrijke structuren van deze verbindingen staan weergegeven in tabel 9 en 10.

			
	R ₁	R ₂	Salt
BRL 26830A	H	CO ₂ CH ₃	$\frac{1}{2}$ Fumarate
BRL 33725A	CF ₃	CO ₂ CH ₃	HCl
BRL 35135A	Cl	OCH ₂ CO ₂ CH ₃	HBr
BRL 28410	H	CO ₂ H	—
BRL 35113	CF ₃	CO ₂ H	—
BRL 37344	Cl	OCH ₂ CO ₂ H	—

All the compounds are racemic mixtures in which both asymmetrical carbon atoms have the *R* configuration or both have the *S* configuration. This absolute stereochemistry was established by stereospecific synthesis of the enantiomers of BRL 28410 and confirmed by X-ray crystallography of BRL 26830A and BRL 35135A.

Tabel 9. Structuren van BRL-verbindingen.

		Code number and chiral carbons configuration§	
	H	—OH	SR 58372 (SR)
			SR 58373A (SS)
			SR 58374 (RS)
			SR 58375A (RR)
	Cl	—OH	SR 58572A (RR)
			SR 58575A (SS)
			SR 58589 (RS)
			SR 58590 (SR)
	Cl	—OCH ₂	SR 58611A (RS)
		 CO C ₂ H ₅ O	SR 58612A (RR)
			SR 58613A (SS)
			SR 58825A (SR)

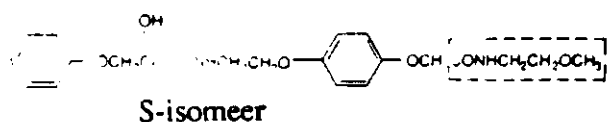
§ Code numbers, if followed by the letter 'A' indicate the HCl salts, but otherwise identify the free bases; the first letter in parentheses indicates configuration of the chiral carbon of the phenylethanolamine and the second one that of the tetraline moiety.

* Indicates chiral carbon.

Tabel 10. Structuurformules van enkele PEAT-verbindingen (phenylethanolaminotetralines).

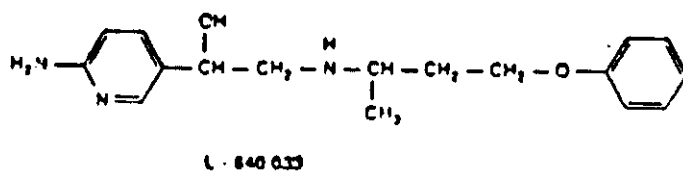
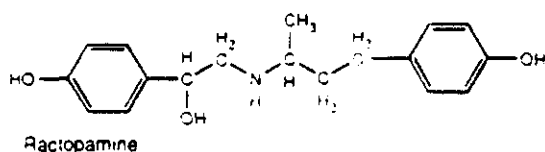
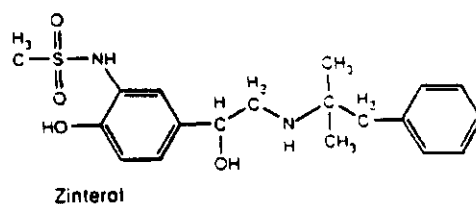
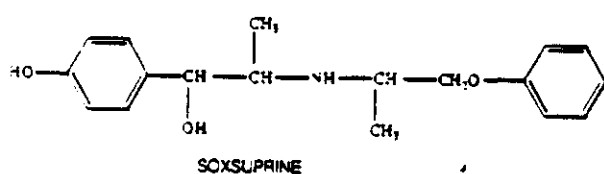
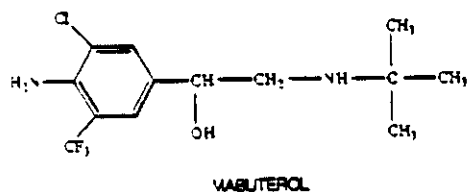
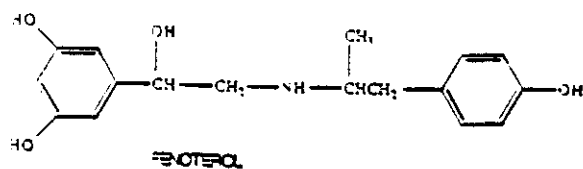
Nog steeds bevatten deze stoffen een aromaat met een amine-zijketen. Echter op de 3- en 4-posities van de aromaat zijn geen OH-groepen aanwezig: soms zijn er zelfs helemaal geen groepen op de 3- en 4-posities van de aromaat. Verder bevindt zich op de amine-zijketen een aromatische groep.

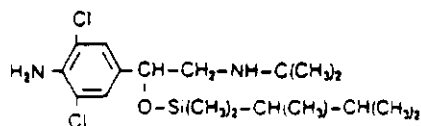
Recent is de ontdekking van de op thermogenese werkende stof ICI D7114 [Holloway, 1991], zie figuur 15.



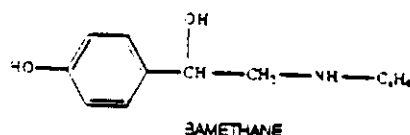
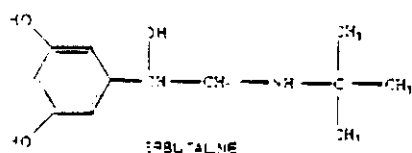
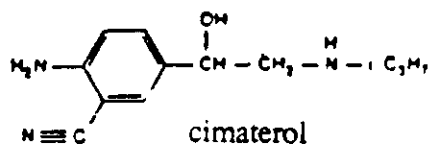
Figuur 15. De structuur van ICI D7114; (---) wordt gemetaboliseerd tot -COOH *in vivo*.

Structuren van andere β -agonisten met een groeibevorderende werking staan weergegeven in figuur 16. Een complete opsomming is dit echter niet, aangezien er steeds meer nieuwe verbindingen met een anabole werking worden ontdekt (in de appendix staan alle structuren van de β -agonisten die hier beschreven zijn nog eens weergegeven).





Q 2636



Carbostyryl-derivaten

	R^1	R^2
	H	H
	H	$\text{CH}(\text{CH}_3)_2$
	H	$\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$
	H	$\text{C}(\text{CH}_3)_3$
	H	CH_2Ph
	H	$\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{Ph}$

Figuur 16. Enkele β -agonisten met anabole werking.

4.6 De ligand-bindingsplaats

Tot nu toe is beschreven welke eigenschappen β -agonisten moeten bezitten om de receptor te stimuleren. De rollen kunnen echter ook omgedraaid worden: er kan ook bekeken worden welke eigenschappen de β -receptor moet bezitten om goed te kunnen functioneren.

Zoals al in hoofdstuk 3 staat beschreven bezit de β -receptor zeven hydrofobe, waarschijnlijk transmembrane, regio's. Deze blijken in de verschillende diersoorten de meest geconserveerde regio's te zijn. Gedacht wordt dat zich op deze regio's de ligand-bindingsplaats bevindt. Om dit te controleren zijn er op het DNA van de β_2 -receptor aminozuursubstitutie- en deletieonderzoeken uitgevoerd. Gevonden is dat de N-groep van zowel agonisten als antagónisten aan Asp¹¹³ in het 3^{de} hydrofobe domein bindt. Als aspartaat (Asp) wordt vervangen door asparagine verdwijnt de activiteit. Bij substitutie met serine (Ser) werden stoffen als ketonen en esters plotseling actief [Strader, 1991]. Glutamaat kon op positie 113 enkele β -antagonisten in partiële agonisten veranderen.

Bij agonisten (behalve clenbuterol) blijken de meta- en para-catechol-OH groepen door resp. Ser²⁰⁴ en Ser²⁰⁷ in de 5^{de} transmembraan helix te worden gebonden. Bovendien blijkt de fenyling bij agonisten aan Phe²⁹⁰ in de 6^{de} transmembrane helix gebonden te

worden.

Binding aan de receptor van een peptide bestaande uit residuen uit de 2^{de} helix toont aan dat ook deze helix mogelijk betrokken is bij de binding [Dohlman, 1988].

Verder is gebleken dat de receptor met een deel van zijn 3^{de} intracellulaire loop aan het G-eiwit koppelt. Al deze bovengenoemde residuen bevinden zich circa 30-40% diep in het membraan (zie figuur 8).

Aan het oppervlak bezit de β -receptor koolhydraat-groepen. Deze zijn waarschijnlijk niet betrokken te zijn bij de activiteit. Een rol bij het transport van agonisten naar de hydrofobe ligand-bindingsplaats is wel eens geopperd.

Bovendien zijn cysteïne-residuen aan de oppervlakte aanwezig die mogelijk één of twee sulfide-bruggen vormen. Deze sulfide-bruggen zijn essentieel voor de stabiliteit en juiste conformatie van de receptor, maar bovendien mogelijk betrokken bij de activatie van het receptor-ligand-bindingscomplex. Bij substitutie van de extracellulaire cysteïnes Cys¹⁰⁶, 184, 190, 191 bleken er minder functionele receptoren tot expressie te komen. Gedacht wordt dat deze residuen noodzakelijk zijn voor correcte helix-helix-interacties [Dohlman, 1990]. Reductie van de sulfide-groepen veroorzaakt functionele activatie van de receptor, waarbij de GTP/GDP-uitwisseling door Gs wordt gecataliseerd. Liganden kunnen dan echter slecht binden [Moxham, 1988].

Zeer recent is er echter een artikel verschenen over G-gekoppelde eiwitten die deze bevindingen in een ander daglicht stelt [Hibert, 1991]. G-gekoppelde receptoren als serotonerge, dopaminerge, muscarinerge en adrenerge receptoren produceren cAMP na activatie en koppeling aan G-eiwit (zie 4.1). Met behulp van de computer zijn drie-dimensionale structuren voor deze receptoren gebouwd en geanalyseerd. De aanname die hierbij gemaakt is, is dat de aminozuren die geconserveerd zijn binnen de transmembrane regio's van de meeste G-gekoppelde receptoren noodzakelijk zijn voor de opvouwing en functie van deze receptoren (koppelen aan G-eiwit). De aminozuren die daarentegen slechts binnen een subklasse van de G-gekoppelde receptoren geconserveerd zijn spelen een rol bij de binding of activatie specifiek voor die subklasse receptoren. Op deze wijze werden 22 G-gekoppelde receptoren geanalyseerd.

Bij het vergelijken van de aminozuursequenties werd een nieuwe nummering aangehouden: de eerste transmembrane helix heet H1 en bevat residuen 101, 102, 103 etc. In de tweede regio H2 bevinden zich de residuen 201, 202 etc. Bijvoorbeeld de bovengenoemde Asp¹¹³ wordt hier Asp³⁰⁸ genoemd (zie tabel 11 in vergelijking met figuur 9 op blz. 25);

Asp¹¹³ -----> Asp³⁰⁸
Ser^{204,207} -----> Ser^{504,507}
Phe²⁹⁰ -----> Phe⁶¹⁷

Alignment of the seven selected regions putatively included in transmembrane domains (labeled H₁ to H₇)

The considered receptors are 5-HT_{1A} (1), 5-HT₂ (2), 5-HT_{2C} (3), D₁ (4), D₂ (5), D₃ (6), α₁ (7), α₂ (8), β₁ (9), β₂ (10), β₃ (11), m₁ (12), m₂ (13), m₃ (14), m₄ (15), m₅ (16), r opsin (17), g opsin (18), b opsin (19), d opsin (20), substance K receptor (21), cannabinoid receptor (22), and bacteriorhodopsin (23). For convenience, the residues are numbered 101, 102, etc., in helix H1; 201, 202, etc., in helix H2; etc. Invariant residues in all GPCR or in subclasses are boxed.

	100	110	120	200	210	220	300	310	320
Serotonin	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Dopamine	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Noradrenaline	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Adrenaline	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Acetylcholine	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Magnesium	6	6	6	6	6	6	6	6	6
opsin	7	7	7	7	7	7	7	7	7
Substance K	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Cannabinoid	9	9	9	9	9	9	9	9	9
Bacteriorhodopsin	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	110	120	210	220	310	320	410	420	430
Serotonin	11	11	11	11	11	11	11	11	11
Dopamine	12	12	12	12	12	12	12	12	12
Noradrenaline	13	13	13	13	13	13	13	13	13
Adrenaline	14	14	14	14	14	14	14	14	14
Acetylcholine	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Magnesium	16	16	16	16	16	16	16	16	16
opsin	17	17	17	17	17	17	17	17	17
Substance K	18	18	18	18	18	18	18	18	18
Cannabinoid	19	19	19	19	19	19	19	19	19
Bacteriorhodopsin	20	20	20	20	20	20	20	20	20
	440	450	540	550	640	650	740	750	760
Serotonin	21	21	21	21	21	21	21	21	21
Dopamine	22	22	22	22	22	22	22	22	22
Noradrenaline	23	23	23	23	23	23	23	23	23
Adrenaline	24	24	24	24	24	24	24	24	24
Acetylcholine	25	25	25	25	25	25	25	25	25
Magnesium	26	26	26	26	26	26	26	26	26
opsin	27	27	27	27	27	27	27	27	27
Substance K	28	28	28	28	28	28	28	28	28
Cannabinoid	29	29	29	29	29	29	29	29	29
Bacteriorhodopsin	30	30	30	30	30	30	30	30	30

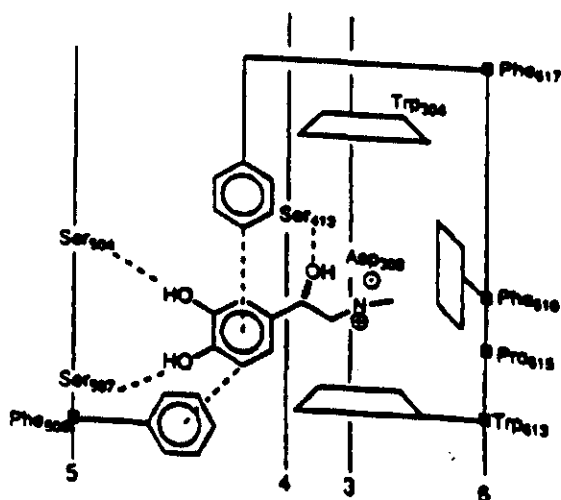
Tabel 11. Vergelijking en nieuwe nummering van de zeven transmembrane regio's van G-gekoppelde eiwitten.

Ontdekt werd dat bovengenoemde Asp³⁰⁸, alleen geconserveerd in cationische neurotransmitter G-gekoppelde receptoren, zich op de bodem van de spleet (gevormd door de transmembrane regio's) bevindt, omringd met twee hydrofobe 'pockets'. De meeste aromatische residuen (uit H4,5 en 6) liggen in de eerste pocket, terwijl de niet-aromatische hydrofobe residuen van H1 en H2 in de tweede pocket liggen.

Geconcludeerd wordt dat, in overeenstemming met experimentele gegevens, de eerste regio overeenkomt met de agonist-bindingsplaats. Een aantal natuurlijke liganden werden

z6 in hun receptoren geplaatst ('docken'), dat hun cationische deel met de Asp een electrostatische interactie kon aangaan. De rest van het ligand werd in de nabijgelegen eerste pocket geplaatst, waar zich de residuen bevinden die alleen bij cationische neurotransmitter receptoren geconserveerd zijn. H-bruggen en aromatische interacties werden vervolgens geoptimaliseerd, waarna een energiminimalisatie werd uitgevoerd (standaard QSAR-technieken).

Hierbij bleek dat drie aromatische residuen het aspartaat-ammonium-complex stabiliseren door een hydrofobe cluster er omheen te vormen (Trp³⁰⁴, Trp⁶¹³, Phe⁶¹⁶). De rest van de agonist interageert met Trp⁴⁰⁶, Phe⁵⁰⁸ en Phe⁶¹⁷ in de eerste hydrofobe pocket (zie figuur 17).



Figuur 17. Schematische weergave van de interactie tussen de β_2 -receptor en noradrenaline.

Trp⁴⁰⁶ en Trp⁶¹³ vormen aryl-aryl orthogonale interacties met Tyr⁵¹⁹ en Phe⁶⁰⁹. Trp⁷¹² interageert op dezelfde wijze met Trp⁷¹⁵. Deze residuen stabiliseren de structuur door het vormen van een netwerk van interhelische interacties. Daarbij kan interactie van de neurotransmitter met nabijgelegen aromatische residuen een conformationele verandering induceren, die zich voortzet in de structuur via deze aromatische verbindingen.

Verdere interacties: Trp⁴⁰⁶ met Pro⁵¹¹, Tyr⁷²⁵ met Asp[?], Asp¹¹⁷ met Asp²⁰⁹, Asn⁷²¹ met CO-groepen, Leu¹¹⁹ en Val¹²⁰ met Leu²⁰⁵ en Ala²⁰⁶.

Deze interacties gelden voor alle G-gekoppelde eiwitten. Specifiek voor de β -receptor zijn de interacties van Ser⁵⁰⁴ en Ser⁵⁰⁷ met de catechol-OH-groepen, en de -stereo-specifieke- interactie van de Ser⁴¹³ met de β -OH-groep van de β -agonisten. Bovendien vindt er bij aromatische neurotransmitters een interactie met Phe⁶¹⁷ plaats (zie figuur 17).

Er zijn verscheidene residuen aangewezen die mogelijk betrokken zijn bij de conformatieverandering van de receptor:

- 1) Trp⁶¹³, Phe⁶¹⁶ en Trp⁴⁰³: interageren met het amine-deel van de ligand.
- 2) Phe⁵⁰⁸ en Phe⁶¹⁷: interageren met het niet-basische deel van de ligand.
- 3) Tyr⁷¹⁵: interageert mogelijk met Asp³⁰⁸ of Asp²⁰⁹.

Door binding zouden zijketens van deze residuen van conformatie veranderen, welke direct effect zou hebben op de conformaties van nabijgelegen aromatische residuen op de helices, waardoor de koppeling aan G-eiwit beïnvloed wordt.

Uiteindelijk blijken bovengenoemde onderzoeksresultaten te overlappen wat betreft de binding van β -agonist: Asp- en Ser-residuen blijken uit alle studies van belang te zijn. Voor receptor-activatie en conformatieverandering levert het laatstgenoemde onderzoek nieuwe hypothesen. Mogelijk bevinden de verschillen tussen β_1 -, β_2 - en β_3 -receptoren zich ook -deels?- in de bovengenoemde conformatieveranderingen op de helices.

HOOFDSTUK 5: HORMOONREGULATIE DOOR BETA-AGONISTEN

5.1 Inleiding

Allerlei aspecten van de werking van β -agonisten zijn in de voorgaande hoofdstukken aan de orde gekomen. Eén belangrijk punt is echter slechts sporadisch genoemd: de mogelijkheid dat β -agonisten de hormoonhuishouding beïnvloeden. Er zijn allerlei hormonen betrokken bij groei, die mogelijk mede verantwoordelijk kunnen zijn voor de anabole werking van de β -agonisten. Mogelijk betrokken hormonen zijn: insuline, groeihormoon, schildklierhormonen, sexhormonen en glucocorticoïden.

De werking van deze hormonen en somatomedine-C (IGF-1) op de groei, eiwit- en vettoename staat hieronder weergegeven (tabel 12).

Hormoon	groei (eiwit)	hoeveelh. vet
Groeihormoon	+	-
Insuline	+	+
T ₃ en T ₄ *	-	-
Somatomedine-C	+	+
Catecholamines	+	-
Glucocorticoïden	-	+
Sexhormonen:		
- Androgenen	+	-
- Oestrogenen**	+	-

+ = anabole werking, - = catabole werking, * = hoge dosis, ** = lage dosis.[Brenner]

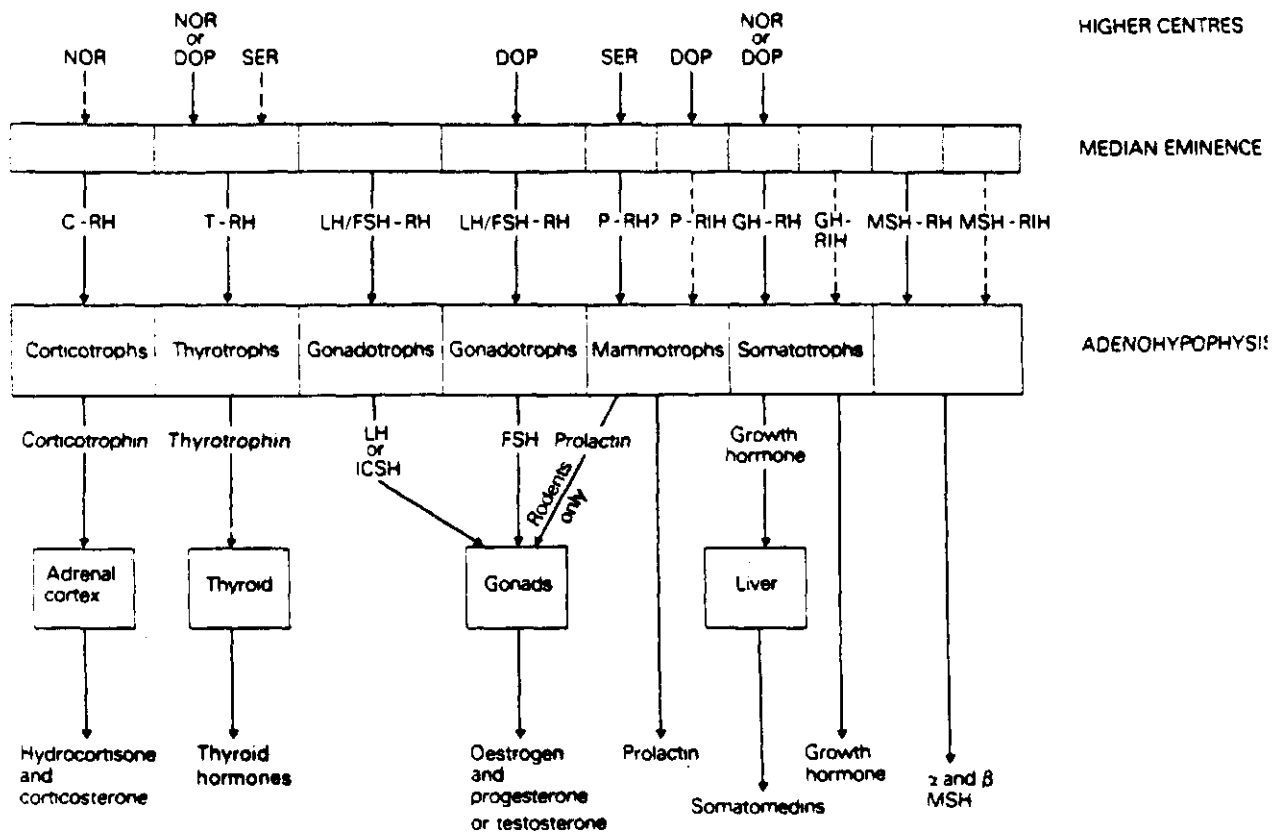
Tabel 12. Overzicht van de werking van hormonen en somatomedine-C op groei, eiwit- en vettoename.

Uit deze tabel blijkt dat groeihormoon en sexhormonen dezelfde werking op eiwit en vet hebben als de catecholamines adrenaline en noradrenaline. Een indirecte werking van β -agonisten op groeihormoon en/of sexhormonen kan dus de verkregen effecten verklaren. Daarom zal met name aan deze hormonen aandacht worden besteed in de volgende paragrafen.

Lipofiele stoffen als clenbuterol kunnen in de hersenen komen door de bloed-hersenbarrière te passeren. Daarom is het van belang te weten welke adeno-hypofysaire hormoonsecretie veranderd kan worden met adrenerge stoffen die de bloed-

hersenbarrière kunnen passeren. In figuur 18 staat weergegeven hoe hormoonsecretie fysiologisch beïnvloed kan worden. Noradrenaline blijkt in de hypofyse invloed uit te oefenen op de vrijzetting van glucocorticoïden (uit de bijnier; remming), schildklierhormonen (stimulatie) en groeihormoon (stimulatie). In de volgende paragrafen komen deze stoffen aan de orde.

Omgekeerd modificeren perifeer vrijgezette hormonen de hoeveelheid amines in de hypothalamus. Zo veroorzaakt gonadectomie een verhoging van de hoeveelheid FSH, gedeeltelijk via verhoging van de hoeveelheid noradrenaline.



Figuur 18. Weergave van de regulatie van hormoonsecretie uit de adenohipofyse, en hormoonsecretie onder regulatie van de adenohipofyse.

NOR = Noradrenaline, DOP = Dopamine, SER = Serotonine [Bowman, 1989].

5.2 Insuline

De interactie van β -agonisten met insuline is grondig onderzocht. Insulinesecretie uit de pancreas wordt door β -agonisten gestimuleerd. Vreemd genoeg kan met geïsoleerde eilandjes van Langerhans uit de rat wel cAMP-productie en glucagon-secretie worden gemeten, maar geen insuline-secretie [Lacey, 1991]. *In vivo* blijken clenbuterol en andere β -agonisten slechts weinig effect te hebben op de insulinesecretie in ratten [Buttery, 1987].

Bij langdurige β -agonist-behandeling vermindert de hoeveelheid insuline of blijft deze gelijk. De spiergroei in zwaar diabetische ratten en diabetische ratten die dagelijks insuline kregen is na β -agonist-behandeling gelijk [Liu, 1989 en Beermann, 1987]. Daaruit blijkt dat veranderingen in de hoeveelheid circulerende insuline waarschijnlijk niet betrokken zijn bij de β -agonist-geïnduceerde spiergroei in normale dieren.

Insuline kan echter wel het aantal β -receptoren reguleren [Buttery, 1987, zie tabel 13].

5.3 Groeihormoon

Groeihormoon werkt via verhoging van de plasmaconcentratie IGF-1, maar na 8 dagen clenbuterol-behandeling van dwergmuizen (3 mg/kg voedsel) wordt geen verandering in IGF-1-hoeveelheid waargenomen [Bates, 1991]. Na 16 dagen clenbuterol-behandeling van ratten wordt ook geen verandering in de hoeveelheid groeihormoon waargenomen [Yang, 1989 en Gabriel, 1989]. In mensen blijkt toediening van clenbuterol geen invloed te hebben op de concentratie groeihormoon [Laakmann, 1990]. Clenbuterol kan wel GH-secretie veroorzaken in runder-adenohypofysaire cellen, maar vreemd genoeg niet dosis-afhankelijk [Welsh, 1987].

De hoeveelheid groeihormoon in schapen wordt na 6 weken cimaterol-behandeling 2-3 maal zo hoog, maar vreemd genoeg neemt de hoeveelheid IGF-1 (Insulin-like Growth Factor 1, oftewel somatomedine-C) 34% af.

Groeihormoon veroorzaakt een andere respons dan clenbuterol in kalveren (werkt via satellietcel-proliferatie), wat suggereert dat clenbuterol niet via GH-secretie werkt. Door combinatie van groeihormoon en clenbuterol kan een additieve respons op eiwit-anabolisme verkregen worden [Maltin, 1990].

Een belangrijke aanwijzing dat groeihormoon niet betrokken is bij de anabole werking van β -agonisten is dat hypofysectomie van ratten geen invloed heeft op de anabole werking [Yang, 1989].

5.4 Sexhormonen

Beta-agonisten werken anabool zowel in mannelijke, vrouwelijke als gecastreerde en gehypofysectomeerde dieren [o.a. Rothwell, 1988 en Yang, 19]. Gonadale steroidhormonen lijken dus ook geen rol te spelen bij de β -agonist-geïnduceerde spiergroei (in tegenstelling tot andere groeibevorderende middelen).

Er is echter wel in de uterus een verhoogde progesteron-synthese gevonden, maar geen verhoogde oestrogen-synthese na β -agonist-stimulatie [Adashi, 1984].

Wel zouden oestrogen-receptoren in parametriaal vet de β -adrenerg-geïnduceerde lipolyse kunnen potentiëren [Lacasa, 1991]. Sexhormonen beïnvloeden het aantal β -receptoren, maar aangezien oestrogen het aantal β -receptoren juist vermindert, kan de oorzaak van bovenstaand effect op deze wijze niet verklaard worden (zie ook tabel 13).

5.5 Schildklierhormonen

Thyroxine is nodig voor normale groei, hoewel hoge concentraties catabool werken. De plasmaconcentratie T_4 neemt met 25% toe in lammeren die 6-12 weken behandeld zijn met cimaterol [Beermann, 1987]. De plasmaconcentratie T_3 blijft onveranderd in deze lammeren en tevens in ratten [O'Connor, 1988].

Een vroege meting van de hoeveelheid T_3 in het plasma bij met clenbuterol behandelde kalveren levert ook geen verandering in T_3 -concentratie op [Blum, 1988].

Ratten, die na thyroïdectomie met clenbuterol worden behandeld, groeien even hard als alleen met clenbuterol behandelde dieren [Buttery, 1987], zodat schildklierhormonen niet betrokken lijken te zijn bij de β -agonist-geïnduceerde spiergroei.

5.6 Prostaglandines

Prostaglandines zijn betrokken bij eiwit-turnover. Een mogelijkheid zou kunnen zijn dat β -agonisten met de prostaglandine-synthese interfereren, en zo eiwit-degradatie moduleren. Er is echter geen bewijs gevonden voor deze hypothese.

5.7 Glucocorticoiden

Behandeling van lammeren met β -agonist heeft geen invloed op de plasma-cortisolconcentratie. Bij met β -agonist behandelde ratten blijkt geen effect te worden waargenomen op totale, vrije en gebonden hoeveelheid corticosteron.

Na adrenalectomie in de rat kan er echter alleen nog spiergroei verkregen worden met β -agonisten als daarnaast ook een vervangingstherapie voor dexamethason wordt uitgevoerd. Zonder dexamethason treedt er verminderde stimulatie van lipolyse op. De conclusie mag echter niet meteen getrokken worden dat glucocorticoiden betrokken zijn

bij de anabole werking: glucocorticoïden hebben namelijk grote invloed op de insuline-status.

De anabool werkzame stof trenbolon remt net als β -agonisten eiwitdegradatie. Trenbolon werkt waarschijnlijk via reductie van het aantal spier-glucocorticoïde-receptoren. Mogelijk werken β -agonisten -deels?- op dezelfde wijze.

Glucocorticoïden reguleren tevens het aantal en de gevoeligheid van β -receptoren in spier: de synthese van β -receptoren wordt door glucocorticoïden gestimuleerd en desensitisatie opgeheven [Nabishah, 1990; zie ook tabel 13].

5.8 Samenvatting

De spieren van met β -agonist behandelde ratten die hypofysectomie hebben ondergaan zijn groter dan die van controle ratten met een hypofysectomie. Daaruit blijkt dat hypofysaire hormoonsecretie niet noodzakelijk is voor β -agonist-geïnduceerde spiergroei. Ook sexhormonen en schildklierhormonen lijken niet betrokken bij de anabole werking van β -agonisten. Verder is gebleken dat met β -agonist-behandeld serum van ratten dezelfde anabole activiteit als normaal serum van ratten heeft, hetgeen weer een aanwijzing is dat endocriene factoren niet betrokken zijn. Alleen glucocorticoïden zijn mogelijk betrokken bij de anabole werking van β -agonisten, maar het exacte werkingsmechanisme moet nog uitgezocht worden.

Bij de hierboven vermelde onderzoeken zijn de hoeveelheden hormoon gemeten na langdurige β -agonist-toediening, zodat de relatie met de - snelle - anabole weking op spier niet duidelijk is. Metingen in de tijd zouden hier nuttig zijn.

5.9 Regulatie van de β -receptor

Allerlei hormonen blijken in staat de β -receptor te reguleren. Mogelijk zijn deze stoffen dus toch indirect betrokken bij de anabole werking van β -agonisten (zie tabel 13).

Tissue	Hormone treatment	Receptor number	Receptor coupling	Adenylate cyclase
Muscle cell	dexamethasone	ND	ND	↓
Heart	adrenalectomy	↑	ND	ND
Lung	hydrocortisone	↑	ND	ND
Fat	hypothyroid	↓	ND	ND
Lung	hypothyroid	→	ND	ND
Heart	hyperthyroid	↑	↑	↑
	hypothyroid	↓	→	↓
Kidney	androgen	↑	ND	ND
Ovary	progesterone	↑	ND	ND
	oestrogen	↓	ND	ND

See review by Stiles *et al.*, 1984 for details

ND - not defined; ↑ - increase; ↓ - decrease; → - no change

Tabel 13. Beta-receptorregulatie in ratten.

HOOFDSTUK 6: CONCLUSIES

Beta-agonisten zijn stoffen die functioneel binden aan β -receptoren, wat als belangrijkste gevolgen heeft: stimulatie van hartfunctie, relaxatie van enkele gladde spieren en bloedvaten, en beïnvloeding van metabole processen. Met name in de therapie bij hartklachten en astma worden β -agonisten gebruikt. Hun structuur is afgeleid van de fysiologische catecholamines adrenaline en noradrenaline. Sinds enkele jaren is het - illegale- gebruik van β -agonisten als groeibevorderaars ontdekt: in de veeteelt worden deze stoffen gebruikt om de hoeveelheid vet te verlagen, terwijl de hoeveelheid spierweefsel verhoogd wordt (zogenaamde herverdeling).

Bij onderzoek is naar voren gekomen dat β -agonisten direct op vetweefsel werken door de activiteit van een lipase te verhogen. Op spierweefsel werken de stoffen mogelijk ook direct, via een verlaging van de eiwitdegradatie. Gevonden is dat intracellulair de hoeveelheid calpastatine wordt verhoogd na behandeling met β -agonist. Deze stof staat bekend als protease-remmer en zou op deze wijze de eiwitdegradatie kunnen verminderen.

Om te weten te komen hoe β -agonisten op moleculair niveau hun werking uitoefenen, moet eerst het eiwit waaraan deze stoffen binden onderzocht worden: de β -receptor. De primaire structuur van deze receptor is al enige tijd bekend. Gebleken is dat er vele subtypes van deze receptor bestaan. Naast de β_1 - en β_2 -receptor is er nu ook sprake van β_3 - en atypische receptoren. Duidelijk is geworden dat er een atypische β -receptor op vetweefsel aanwezig is, die betrokken is bij de vermindering van de hoeveelheid vet. Ook in spierweefsel kan zo'n atypische β -receptor aanwezig zijn, hoewel spiergroei waarschijnlijk voor een groot deel via β_2 -receptoren teweeg wordt gebracht.

Beta-agonisten blijken op verschillende wijze de receptor te binden en te activeren. Als de binding van een β -agonist aan de receptor wordt bekeken, blijken een aantal aminozuren op de receptor essentieel te zijn; Asp¹¹³, Ser^{204,207}, Phe²⁹⁰. Een fraai drie-dimensionaal model van de β_2 -receptor is hiervoor recent opgesteld.

Onderzoek naar de structuur van β_2 -agonisten toonde aan dat een catecholgroep en een aminezijketen met een β -OH-groep essentieel zijn voor activiteit. De catechol-OH's binden Ser^{204,207} van de β_2 -receptor, het aromaatdeel bindt Phe²⁹⁰, terwijl het aminedeel Asp¹¹³ bindt.

Bekende β_2 -agonisten als isoprenaline blijken een anabole werking te hebben. Recent zijn er echter nieuwe β -agonisten bekend geworden, die ook een groeibevorderende werking bezitten. Zij bezitten geen catecholgroep, maar een aromaatgroep zonder soms zelfs één substituent op de 3- en 4-posities. Daarnaast bezitten zij evenals de bovengenoemde β_2 -agonisten een aminezijketen, met daaraan een grote aromaatgroep. Mogelijk werken enkele van deze agonisten via binding aan een atypische β -receptor. Verder onderzoek naar deze stoffen moet opheldering verschaffen. Bovendien moeten de detectiemethoden zo snel mogelijk aangepast worden om misbruik van deze nieuwe β -agonisten in de veeteelt aan te kunnen tonen.

Beta-agonisten zouden echter niet alleen via de β -receptor werkzaam kunnen zijn, maar ook via een indirect mechanisme. Mogelijk zouden zij de secretie van groeihormoon, sexhormonen, schildklierhormonen en glucocorticoïden kunnen beïnvloeden. Met behulp van onderzoek is er echter alleen een verband tussen de anabole werking van β -agonisten en glucocorticoïde-afgifte gevonden. Wel kunnen verscheidene hormonen de hoeveelheid β -receptoren reguleren.

Uit dit rapport blijkt dat met name de β -receptor een belangrijk aangrijpingspunt vormt voor de ontwikkeling van nieuwe detectiemethoden voor β -agonisten. Mogelijk zou een kolom waaraan β -receptoren gebonden zijn uitkomst bieden. Beta-agonisten zouden met behulp van zo'n kolom in urinemonsters aangetoond kunnen worden (door binding van de β -agonisten aan de β -receptoren op de kolom). Onderzoek naar deze detectiemethode is begonnen en zal moeten aantonen of voorgenoemde methode werkzaam is. Tevens is het van groot belang dat met bovengenoemde detectiemethoden ook de nieuw ontwikkelde β -agonisten kunnen worden aangetoond.

LITERATUUR

- Adashi E.J., Hsueh A.J.W.
Hormone receptors in ovarian granulosa cells.
In: The receptors 1. Ed. Conn P.M. Academic Press (1984).
- Arch J.R.S., Ainsworth A.T., Cawthorne M.A., Piercy V., Sennitt M.V., Thody V.E., Wilson C., Wilson S.
Atypical β -adrenoceptor on brown adipocytes as target for anti-obesity drugs.
Nature 309: 163-166 (1984).
- Arch J.R.S., Bywater R.J., Coney K.A., Ellis R.D.M., Thurlby P.L., Smith S.A., Zed C.
Influences on body composition and mechanism of action of the β -adrenoceptor agonist BRL26830A.
In: Hormones, thermogenesis, and obesity. Elsevier Science Publishing Co. Inc. Ed. Lardy H., Stralman F. (1989).
- Bahouth S.W., Malbon C.C.
Subclassification of β -adrenergic receptors of rat fat cells: a re-evaluation.
Mol. Pharmacol. 34: 318-326 (1988).
- Bates P.C.
Action and interaction of growth hormone and the β -agonist clenbuterol on growth, body composition and protein turnover in dwarf mice.
Br. J. Nutr. 65: 115-129 (1991).
- Baracos V.E., Greenberg R.E., Goldberg A.L.
Calcium ions and the regulation of intracellular protein breakdown in muscle.
In: Calcium regulation in biological systems: 227-242. Ed. Ebashi S. et al., Academic Press (1984).
- Beermann D.H., Butler W.R., Hogue D.E., Fishell V.K., Dalrymple R.H., Ricks C.A., Scanes C.G.
Cimaterol-induced muscle hypertrophy and altered endocrine status in lambs.
J. Anim. Sci. 65: 1514-1524 (1987).
- Bianchetti A, Manara L.
In vitro inhibition of intestinal motility by phenylethanolaminotetralines: evidence of atypical β -adrenoceptors in rat colon.
Br. J. Pharmacol. 100: 831-839 (1990).
- Bilezikian J.P., Dornfeld A.M., Gammon D.E.
Structure-binding-activity analysis of beta-adrenergic amines -I and -II.
Biochem. Pharmacol. 27: 1445-1461 (1978).
- Blum J.W., Flueckiger N.
Early metabolic and endocrine effects of perorally administered β -adrenoceptor agonists in calves.
Eur. J. Pharmacol. 151: 177-187 (1988).

- Bohorov O., Buttery P.J., Correia J.H.R.D., Soar J.B.
The effect of the β -2-adrenergic agonist clenbuterol or implantation with oestradiol plus trenbolone acetate on protein metabolism in wether lambs.
Br. J. Nutr. 57: 99-107 (1987).
- Bond R.A., Clarke D.E.
Agonist and antagonist characterization of a putative adrenoceptor with distinct pharmacological properties from the α - and β -subtypes.
Br. J. Pharmacol. 95: 723-734 (1988).
- Bowman W.C., Rand M. J., West G.B.
Textbook of Pharmacology.
Blackwell Scientific Publications (reprint, 1989).
- Brenner von K.V.
Wirkungsmechanismus und effekte von repartitioning-substanzen in der schweinemast.
Dtsch. tierärztl. Wschr. 97: 196-202 (1990).
- Bukowiecki L.J., Folléa N., Lupien J., Paradis A.
Metabolic relationships between lipolysis and respiration in rat brown adipocytes.
J. Biol. Chem. 256 (24): 12840-12848 (1981).
- Challiss R.A., Leighton B., Wilson S., Thurlby P.L., Arch J.R.S.
An investigation of the β -adrenoceptor that mediates metabolic responses to the novel agonist BRL28410 in rat soleus muscle.
Biochem. Pharmacol. 37 (5): 947-950 (1988).
- De Vente J., Bast A., Van Bree L., Zaagsma J.
B-adrenoceptor studies 6. Further investigations on the hybrid nature of the rat adipocyte β -adrenoceptor.
Eur. J. Pharmacol. 63: 73-83 (1980).
- Dohlamn H.G., Caron M.G., Strader C.D., Amlailey N., Lefkowitz R.J.
Identification and sequence of a binding site peptide of the β_2 -adrenergic receptor.
Biochemistry 27: 1813-1817 (1988).
- Dohlman H.G., Caron M.G., DeBlasi A., Frielle T., Lefkowitz R.J.
Role of extracellular disulfide-bonded cysteines in the ligand binding function of the β_2 -adrenergic receptor.
Biochemistry 29: 2335-2342 (1990).
- Dove S., Franke R.
Model-based LFER parameters and QSAR of ligand β -adrenoceptor interactions.II. Estimations and QSAR of agonistic potency and receptor affinity in a series of β -adrenergic phenethanolamines.
Quant. Struct.-Act. Relat. 10: 23-30 (1991).
- Duquette P.F., Rickes E.L., Olson G., Convey E.M.
No. 200: Performance, carcass composition and carcass characteristics of lambs fed the β -agonist L-644,969.
No. 201: Performance, carcass composition and carcass characteristics of steers fed the β -agonist L-644,969.
J. Anim. Sci. 65 (Supl.): 275-276 No. 200, 201 (1987).

- Eisen E.J., Croom W.J.Jr., Helton S.W.
Differential response to the β -adrenergic agonist cimaterol in mice selected for rapid gain and unselected controls.
J. Anim. Sci. 66: 361-371 (1988).
- Ellerbroek von L.
Eine Übersicht zu diagnosemöglichkeiten unerlaubter arzneimittelapplikationen bei der schlachtier- und fleischuntersuchung.
Dtsch. tierärztl. Wschr. 97: 307-313 (1990).
- Emorine L.J., Marullo S., Briend-Sutren M., Patey G., Tate K., Delavier-Klutchko C., Strosberg A.D.
Molecular characterization of the human β_3 -adrenergic receptor.
Science 245: 1118-1121 (1989).
- Emorine L.J., Feve B., Pairault J., Briend-Sutren M., Marullo S., Delavier-Klutchko C., Strosberg A.D.
Structural basis for functional diversity of β_1 -, β_2 - and β_3 -adrenergic receptors.
Biochem. Pharmacol. 41: 853-859 (1991).
- Gabriel A., Istasse L., Clinquart A., Dufrasne I., Van Eenaeme C., Gielen M., Bienfait J.M.
Quelques considérations sur l'utilisation des bêta-agonistes dans le cadre de la production de viande.
Ann. Méd. Vét. 133: 281-291 (1989).
- Gustin P., Ansay M., Maghuin-Rogister G.
La pharmacologie et le problème des résidus des agonistes β_2 -adrenergiques chez les bovins.
Ann. Méd. Vét. 133: 293-311 (1989).
- Hausman D.B., Martin R.J., Veenhuizen E.L., Anderson D.B.
Effect of ractopamine on insulin sensitivity and response of isolated rat adipocytes.
J. Anim. Sci. 67: 1455-1464 (1989).
- Hibert M.F., Trumpp-Kallmeyer S., Bruinvels A., Hoflack J.
Three-dimensional models of neurotransmitter G-binding protein-coupled receptors.
Mol. Pharmacol. 40: 8-15 (1991).
- Higgins J.A., Lasslett Y.V., Bardsley R.G., Buttery P.J.
The relation between dietary restriction or clenbuterol (a selective β_2 agonist) treatment on muscle growth and calpain proteinase (EC 3.4.22.17) and calpastatin activities in lambs.
Br. J. Nutr. 60: 645-652 (1988).
- Hollenga Ch., Zaagsma J.
Direct evidence for the atypical nature of functional β -adrenoceptors in rat adipocytes.
Br. J. Pharmacol. 98: 1420-1424 (1989).
- Hollenga Ch., Brouwer F., Zaagsma J.
Relationship between lipolysis and cAMP generation mediated by atypical β -adrenoceptors in rat adipocytes.
Br. J. Pharmacol. 102: 577-580 (1991).
- Holloway B.R., Howe R., Rao B.S., Stribling D., Mayers R.M., Briscoe M.G., Jackson J.M.
ICI D7114 a novel selective β -adrenoceptor agonist selectively stimulates brown fat and increases whole-body oxygen consumption.
Br. J. Pharmacol. 104: 97-104 (1991).

- Jack D.
The 1990 Lilly prize lecture: a way of looking at agonism and antagonism: lessons from salbutamol, salmeterol and other β -adrenoceptor agonists.
Br. J. Clin. Pharmac. 31: 501-514 (1991).
- Jéquier R.
Energy utilization.
In: Human obesity. Ann. N. Y. Sci. 499 (1987). Ed. Wurtman R.J., Wurtman J.J.
- Jones R.W., Easter R.A., McKeith F.K., Dalrymple R.H., Maddock H.M., Bechtel P.J.
Effect of the β -adrenergic agonist cimaterol on the growth and carcass characteristics of finishing swine.
J. Anim. Sci. 61 (4): 905-913 (1985).
- Kaumann A.J.
Is there a third heart β -adrenoceptor?
TiPS 10: 316-320 (1989).
- Kim Y.S., Lee Y.B., Dalrymple R.H.
Effect of the repartitioning agent cimaterol on growth, carcass and skeletal muscle characteristics in lambs.
J. Anim. Sci. 65: 1392-1399 (1987).
- Kretchmar D.H., Hathaway M.R., Epley R.J., Dayton W.R.
Effects of a dietary β -agonist on calcium-activated proteinase and cathepsin activities in ovine muscle tissue.
J. Anim. Sci. 66 (Suppl.): 278-279 No.148 (1988).
- Kretchmar D. H., Hathaway M.R., Epley R.J., Dayton W.R.
Alterations in postmortem degradation of myofibrillar proteins in muscle of lambs fed a β -adrenergic agonist.
J. Anim. Sci. 68: 1760-72 (1990).
- Laakmann G., Munz T., Hinz A., Voderholzer U.
Influence of clenbuterol, a β -adrenergic agonist, on desipramine induced growth hormone, prolactin and cortisol stimulation.
Psychoneuroendocrin. 15 (5/6): 391-399 (1990).
- Lacasa D., Agli B., Pecquery R., Giudicelli Y.
Influence of ovariectomy and regional fat distribution on the membranous transducing system controlling lipolysis in rat fat cells.
Endocrinology 128: 747-753 (1991).
- Lacey R.J., Berrow N.S., Scarpello J.H.B., Morgan N.G.
Selective stimulation of glucagon secretion by β_2 -adrenoceptors in isolated islets of Langerhans of the rat.
Br. J. Pharmacol. 103: 1824-1828 (1991).
- Langin D., Portillo M.P., Saulnier-Blanche J-S., Lafontan M.
Coexistence of three β -adrenoceptor subtypes in white fat cells of various mammalian species.
Eur. J. Pharmacol. 199: 291-301 (1991).

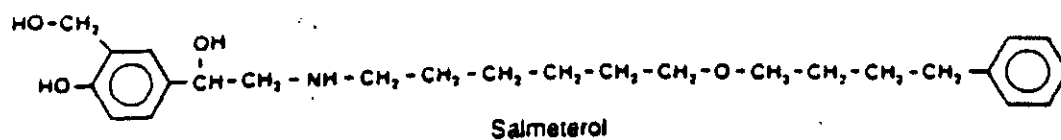
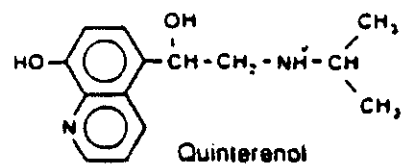
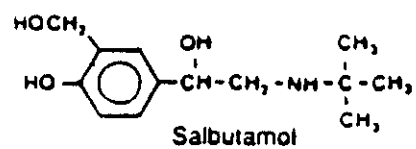
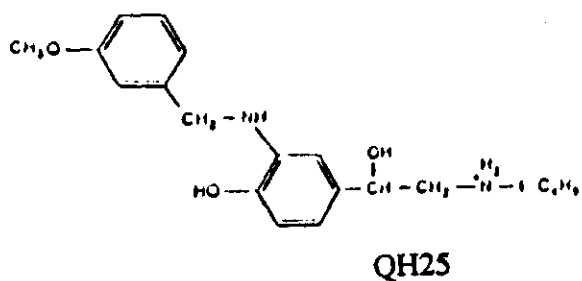
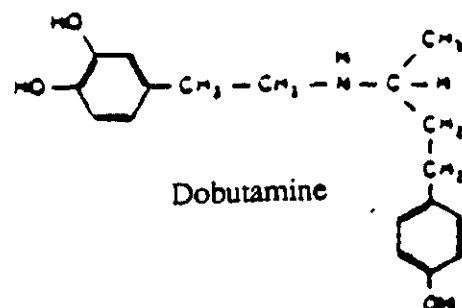
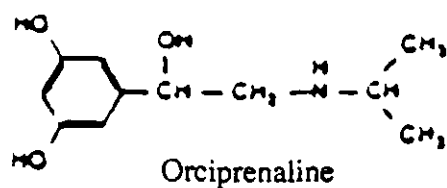
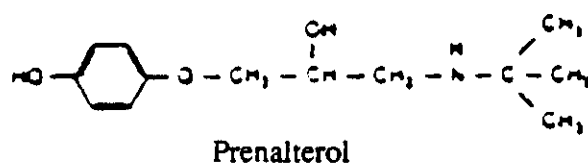
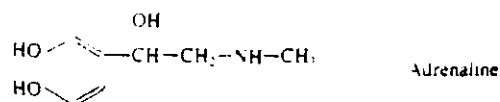
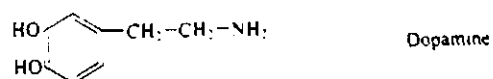
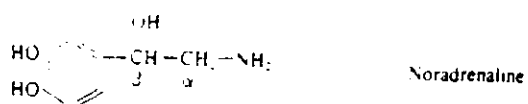
- Liu C.Y., Boyer J.L., Mills S.E.
Beta-adrenergic agonist inhibition of insulin-stimulated lipogenesis in porcine adipocytes.
J. Anim. Sci. 66 (Suppl.): 249 No. 81 (1988).
- Liu C.Y., Mills S.E.
Decreased insulin binding to porcine adipocytes in vitro by beta-adrenergic agonists.
J. Anim. Sci. 68: 1603-1608 (1990).
- MacRae J.C., Shene P.A., Connell A., Buchan V., Lobley G.E.
The action of the β -agonist clenbuterol on protein and energy metabolism in fattening wether lambs.
Br. J. Nutr. 59: 457-465 (1988).
- Maltin C.A., Hay S.M., Delday M.I., Lobley G.E., Reeds P.J.
The action of the β -agonist clenbuterol on protein metabolism in innervated and denervated phasic muscles.
Biochem. J. 261: 965-971 (1989).
- Maltin C.A., Delday M.I., Hay S.M., Innes G.M., Williams P.E.V.
Effects of bovine pituitary growth hormone alone or in combination with the β -agonist clenbuterol on muscle growth and composition in veal calves.
Br. J. Nutr. 63: 535-545 (1990).
- Manara L., Bianchetti A.
The phenylethanolaminotetralines: new selective agonists for atypical β -adrenoceptors.
TIPS 11: 229-230 (1990).
- Martinez-Navarro J.F.
Food poisoning related to consumption of illicit β -agonist in liver.
The Lancet 336: 1311 (1990).
- McElligot M.A., Chaung L.-Y., Barreto Jr. A.
Effects of a beta-adrenergic agonist on protein turnover in muscle cells in culture.
Biochem. Pharmacol. 38 (19): 2199-2205 (1989).
- Mersmann H.J., Hu C.Y., Pond W.G., Ryle D.C., Novakofski J.E., Smith S.B.
Growth and adipose tissue metabolism in young pigs fed cimaterol with adequate or low dietary protein.
J. Anim. Sci. 64: 1384-1394 (1987).
- McLaughlin D.D., MacDonald A.
Characterization of catecholamine-mediated relaxations in rat isolated gastric fundus: evidence for an atypical β -adrenoceptor.
Br. J. Pharmacol. 103: 1351-1356 (1991).
- Miklavc A., Kocjan D., Mavri J., Koller J., Hadzi D.
On the fundamental difference in the thermodynamics of agonist and antagonist interactions with β -adrenergic receptors and the mechanism of entropy-driven binding.
Biochem. Pharmacol. 40 (4): 663-669 (1990).
- Miller M.F., Cross H.R., Wilson J.J., Smith S.B.
Acute and long-term lipogenic response to insulin and clenbuterol in bovine intramuscular and subcutaneous adipose tissues.
J. Anim. Sci. 67: 928-933 (1989).

- Mills S.E., Liu C.Y.
Sensitivity of lipolysis and lipogenesis to dibutyryl-cAMP and β -adrenergic agonists in swine adipocytes *in vitro*.
J. Anim. Sci. 68: 1017-1023 (1987).
- Morgan J.B., Jones S.J., Calkins C.R.
No. 146: Cimaterol-fed broiler chickens: changes in tenderness, cathepsin B activity and composition.
No. 147: Cimaterol-fed broiler chickens: influence on muscle protein turnover.
J. Anim. Sci. 66 (Suppl.): 278 No. 146, 147 (1988).
- Moxham C.P., Ross E.M., George S. T., Malbon C.C.
 β -adrenergic receptors display intramolecular disulfide bridges *in situ*: analysis by immunoblotting and functional reconstitution.
Mol. Pharmacol. 33: 486-492 (1988).
- Nabishah B.M., Merican Z., Morat P.B., Alias A.K., Khalid B.A.K.
Effects of steroid hormones pretreatment on isoprenaline-induced cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in rat lung.
Gen. Pharmac. 21 (6): 935-938 (1990).
- O'Connor R.M., Dwyer D.A., Beermann D.H.
Effects of three-week and six-week cimaterol administration on plasma hormone and glucose concentrations and carcass composition in lambs.
J. Anim. Sci. 66 (Suppl.): 252 No. 87 (1988).
- Offerhaus L.
Clenbuterol: het 'herverdelingsmiddel'.
Ned. Tijdschr. Geneesk. 132 (9): 1782-1785 (1988).
- Peterla T.A., Ricks C.A., Scanes C.G.
Cimaterol, a β -adrenergic agonist, directly affects lipolysis and lipogenesis in porcine adipose tissue *in vitro*.
J. Anim. Sci. 66 (Suppl.): 249 No.80 (1988).
- Peterla T.A., Scanes C.G.
Effect of β -adrenergic agonists on lipolysis and lipogenesis by porcine adipose tissue *in vitro*.
J. Anim. Sci. 68: 1024-1029 (1990).
- Rang H.P., Dale M.M.
Pharmacology, Churchill Livingstone (1987).
- Reeds P.J., Hay S.M., Dorwood P.M., Palmer R.M.
Stimulation of muscle growth by clenbuterol: lack of effect on muscle protein synthesis.
Br. J. Nutr. 56: 249-258 (1986).
- Rogers K.L., Fagan J.M.
The beta-adrenergic agonist cimaterol inhibits protein breakdown in chick skeletal muscle via a nonlysosomal proteolytic mechanism.
J. Anim. Sci. 66 (Suppl.): 277 No. 145 (1988).

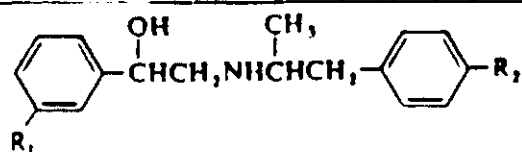
- Rothwell N.J., Stock M.J., Sudera D.K.
Changes in tissue blood flow and β -receptor density of skeletal muscle in rats treated with the β_2 -adrenoceptor agonist clenbuterol.
Br. J. Pharmac. 90: 601-607 (1987).
- Rothwell N.J., Stock M.J.
Increased body-weight gain and body protein in castrated and adrenalectomized rats treated with clenbuterol.
Br. J. Nutr. 60: 355-360 (1988).
- Sainz R.D., Wolff J.E.
Effects of the β -agonist cimaterol on growth, body composition and energy expenditure in rats.
Br. J. Nutr. 60: 85-90 (1988).
- Schiavetta A.M., Miller M.F., Lunt D.K., Smith S.B.
Changes in adipose tissue cellularity, lipogenic rates and carcass characteristics in steers fed clenbuterol for 50 days and after 90 days withdrawal.
J. Anim. Sci 66 (Suppl.): 251 No. 84 (1988).
- Strader C.D., Gaffney T., Sugg E.E., Candelore M.R., Keys R., Patchett A.A., Dixon R.A.F.
Allele-specific activation of genetically engineered receptors.
J. Biol. Chem. 266: 5-8 (1991).
- Stryer L.
Biochemistry. Freeman W.F. and Co. (third edition, 1988).
- Timmerman, H.
B-adrenergics: physiology, pharmacology, applications, structures and structure-activity relationships. In: Beta-agonists and their effects on animal growth and carcass quality, p13-28. Ed.: J.P. Hanrahan.
- Tota M.R., Candelore M.R., Dixon R.A.F., Strader C.D.
Biophysical and genetic analysis of the ligand-binding site of the β -adrenoceptor.
TIPS 12: 4-6 (1991).
- Wang S-Y., Beermann D.H.
Reduced calcium-dependent proteinase activity in cimaterol-induced muscle hypertrophy in lambs.
J. Anim. Sci. 66: 2545-2550 (1988).
- Waxman L.
Calcium-activated proteases in mammalian tissues.
Methods Enzymol. 80: 664-680 (1981).
- Welsh T.H. Jr., Smith S.B., Sutton M.R., Wagner K.A.
Growth hormone releasing factor and clenbuterol regulation of bovine growth hormone secretion in vitro.
J. Anim. Sci. 65 (Suppl.): 279 No. 208 (1987).
- Williams P.E.V., Pagliani L., Innes G.M., Penine K., Harris C.I., Garthwaite P.
Effects of a β -agonist (clenbuterol) on growth, carcass composition, protein and energy metabolism of veal calves.
Br. J. Nutr. 57: 417-428 (1987).

- Wilson C., Wilson S., Piercy V., Sennitt M.V., Arch J.R.S.
Eur. J. Pharmacol. 100: 309-319 (1984).
- Yang Y.T., McElligott M.A.
Multiple actions of β -adrenergic agonists on skeletal muscle and adipose tissue (review).
Biochem. J. 261: 1-10 (1989).
- Zaagsma J., Nahorski S.R.
Is the adipocyte β -adrenoceptor a prototype for the recently cloned atypical ' β_3 -adrenoceptor'?
TiPS 11: 3-7 (1990).

APPENDIX: Structuren van β -agonisten

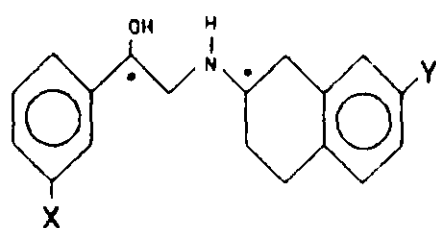


BRL-verbindingen

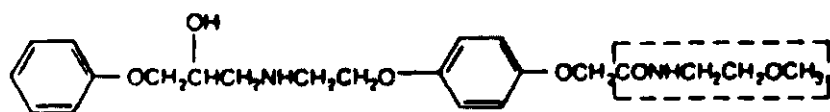


	R ₁	R ₂	Salt
BRL 26830A	H	CO ₂ CH ₃	Fumarate
BRL 33725A	CF ₃	CO ₂ CH ₃	HCl
BRL 35135A	Cl	OCH ₂ CO ₂ CH ₃	HBr
BRL 28410	H	CO ₂ H	—
BRL 35113	CF ₃	CO ₂ H	—
BRL 37344	Cl	OCH ₂ CO ₂ H	—

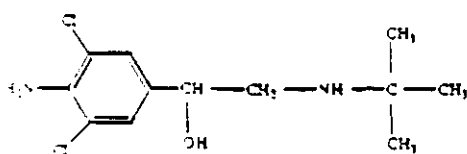
PEAT-verbindingen



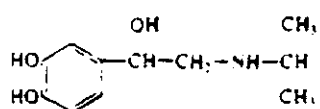
X	Y	Code number and chiral carbons configuration§	
H	-OH	SR 58372	(SR)
		SR 58373A	(SS)
		SR 58374	(RS)
		SR 58375A	(RR)
		SR 58372A	(RR)
Cl	-OH	SR 58575A	(SS)
		SR 58589	(RS)
		SR 58590	(SR)
	-OCH ₂ CO C ₂ H ₅ O	SR 58611A	(RS)
		SR 58612A	(RR)
		SR 58613A	(SS)
		SR 58825A	(SR)



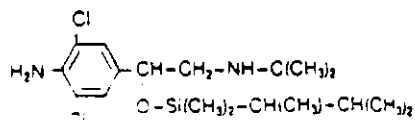
ICI D7114



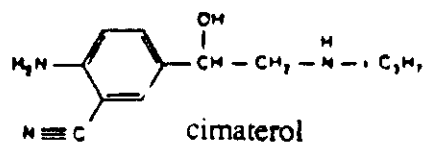
Clenbuterol



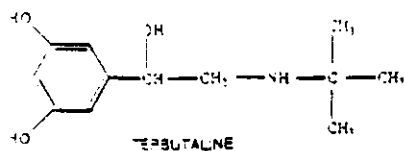
Isoprenaline



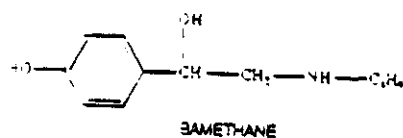
Q 2636



cimaterol

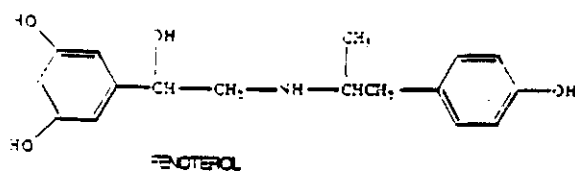
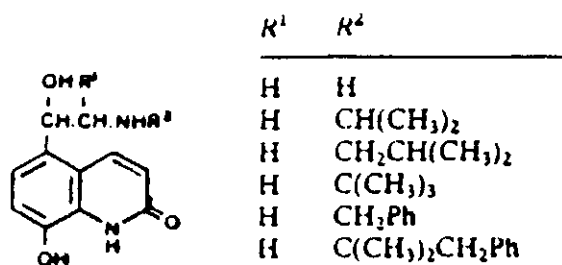


TERBUTALINE

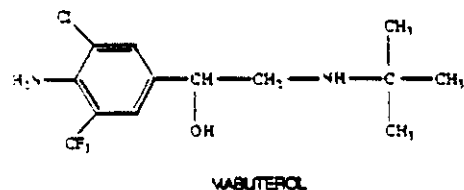


SAMETHANE

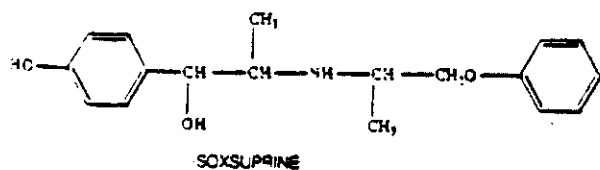
Carbostyryl-derivaten



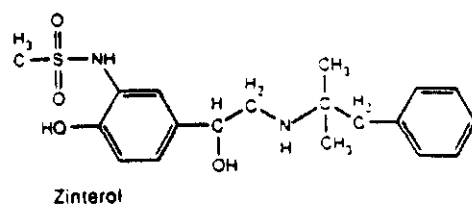
FEOTEROL



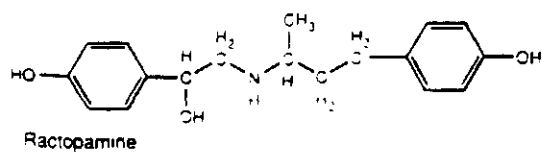
VABUTEROL



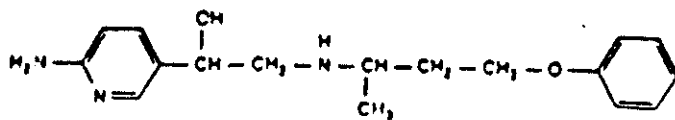
SOXSUPRINE



Zinterol



Ractopamine



L - 640 633