

4. Material und Methoden

Um diese Fragen zu beantworten, wurden endokrinologische, ultrasonographische und pharmakologische Studien durchgeführt. Neben Tieren, die Teil der klinischen Studie zur Effektivität des Antigestagens J956 bzw. des Östrogens EE₂ waren, wurden auch trächtige und nicht trächtige Kontrolltiere endokrinologisch und ultrasonographisch untersucht. Endokrinologie und Ultrasonographie dienten somit der Erweiterung reproduktionsphysiologischer Kenntnisse bei Bären und ergänzten die pharmakologischen Untersuchungen bei der Erarbeitung von Grundlagen für eine postkonzeptionelle Reproduktionskontrolle.

4.1. Materialien

4.1.1. Tiermaterial

Für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen standen 14 Braunbären, ein Kragenbär, ein Brillenbär und ein Schwarzbär aus neun verschiedenen Tiergärten zur Verfügung. Untersuchungen wurden an diesen Bären teilweise über mehrere Jahre durchgeführt.

Diese Bären sind mit ihren reproduktionsphysiologischen Daten (Paarungszeit, Anzahl der Geburten, Geburtstermine, Abstand der Geburten etc.), die sich auf Beobachtungen des Pflegepersonals stützen, ebenso wie mit Angaben zu Alter und Körpermasse in Tab. 1 aufgelistet. Es konnte nur ein Teil der Bären gewogen werden (mit * markiert). Das Gewicht der übrigen Tiere wurde durch Vergleich mit den gewogenen Bären abgeschätzt. Somit können geringfügige Ungenauigkeiten bei den pro kg Körpermasse aufgeführten Dosierungen nicht ausgeschlossen werden.

4.1.2. Chemikalien

Die in den Untersuchungen verwendeten Verbrauchskemikalien (Reinheitsgrad „pro analysi“) wurden von folgenden Firmen bezogen: J. T. Baker, Deventer (Niederlande); Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim; Serva, Heidelberg; Boehringer, Mannheim; Roth, Karlsruhe; Merck/Schuchardt, Hohenbrunn. Die Herkunft spezieller Chemikalien ist im Text gesondert vermerkt.

Tab. 1 Angaben zu Herkunft, Alter, Körpermasse (KM) und Reproduktion aller im Rahmen dieser Studie untersuchten Bären. Die Körpermasse von tatsächlich gewogenen Tieren ist mit * markiert, bei den unmarkierten Werten handelt es sich um Schätzungen.

Tier	Geburtsjahr	Herkunft	KM	Paarungszeit	Geburten			Bemerkungen	Endokr. Untersuch.	Ultras. Untersuch.	Pharm. Untersuch.
					Anzahl	Abstand	Termine				
Suhl I <i>Ursus arctos</i>	1993	TP Suhl	120	-	-	-	-	Kein Kontakt zu männlichen Tieren	1997/98	1995, 1997	-
Suhl II <i>Ursus arctos</i>	1993	TP Suhl	120	-	-	-	-		1997/98	1995, 1997	-
Suhl III <i>Ursus arctos</i>	1993	TP Suhl	140	-	-	-	-		-	1998	-
Tjoma <i>Ursus arctos</i>	1973	Zoo Halle	>200*	-	-	-	-		1997, 1998, 1999	1997	-
Conny <i>Ursus arctos</i>	1989	Zoo Halle	141*	-	-	-	-		1997, 1998, 1999	1997	-
Mascha <i>Ursus arctos</i>	1986	TP Thale	200	Mai	8	jährlich	zwischen 30.12. und 06.01.	1997, 1998, 1999	1995, 1997, 1998, 1999, 2000	1995, 1996, 1997, 1998, 1999, 2000	
Bianca <i>Ursus arctos</i>	1981	TP Stendal	190	Mai	11	jährlich	zwischen 07. - 15.01.	1997, 1998, 1999	1995, 1997, 1998, 1999, 2000	1995, 1996, 1997, 1998, 1999, 2000	
Olga <i>Ursus arctos</i>	1977	TG Hellabrunn	198*	April-Juni 1997: bis 17.04.	mind. 4		27.11., 27.12., 28.12. 1997: 30.12.	MGA-Implantat: Juni 1994, vermutlich verloren	1997/98	1997, 1998	1997, 1998
Vroni <i>Ursus arctos</i>	1977	TG Hellabrunn	230*	April-Juni 1997: bis 04. 07.	mind. 4		15.12., 04.01. 1998: 17.01.	MGA-Implantat: Juni 1994 bis Juni 1997	1997/98	1997	1997
Panja <i>Ursus arctos</i>	1977	TG Hellabrunn	155*	April-Juni 1997: bis 07. 07.	mind. 3		06.01.-15.01.	MGA-Implantat: Juni 1994 bis Juni 1997	1997/98	1997, 1998	1997, 1998

Tab. 1 (Fortsetzung)

Tier	Geburts-jahr	Herkunft	KM	Paarungszeit	Geburten			Bemerkungen	Endokr. Untersuch.	Ultras. Untersuch.	Pharm. Untersuch.
					Anzahl	Abstand	Termine				
Brauni <i>Ursus arctos</i>	1994	WP Lüneburger Heide	130	Juni	1		01.01.		1998	1998, 1999	1998, 1999
Helle <i>Ursus arctos</i>	1994	Alpenzoo Innsbruck	140	April-Juni	-	-	-	1998 erstmals tragend (sonographischer Nachweis)	1998	1998, 1999, 2000	1998, 1999, 2000
Dunkle <i>Ursus arctos</i>	1994	Alpenzoo Innsbruck	140	April-Juni	1	-	22.12.1997		1998	1998	1998
Alte <i>Ursus arctos</i>	1987	Alpenzoo Innsbruck	180	April-Juni	5	jährlich	20.12. - 21.01.		1998	1998, 1999, 2000	1998, 1999, 2000
Gisela <i>Ursus thibetanus</i>	1985	Zoo Halle	170*	Mai/Juni	4	1-2 Jahre	19.01.92; 06.01.93; 09.01.94; 14.01.96;		1997, 1998, 1999	1997, 1998, 1999, 2000	1997, 1998, 1999, 2000
Inca <i>Tremarctos ornatus</i>	1987	Zoo Dortmund	90	April/Mai	4	zwei Jahre	06.11. - 02.03.		1998, 1999	1998, 1999, 2000	1998, 1999, 2000
Mira <i>Ursus americanus</i>	1989	TP Berlin	98*					Nur Pharmakokinetik	-	-	1996, 1997, 1998

4.2. Methoden

4.2.1. Endokrinologische Untersuchungen

Da die Gewinnung von Blutproben bei Zootieren im Allgemeinen nur in Narkose gelingt, wurden zur Erstellung von Hormonprofilen über einen längeren Zeitraum nicht-invasive Verfahren entwickelt, die eine kontinuierliche Probensammlung ohne Beunruhigung der Tiere ermöglichen.

In der vorliegenden Studie wurden mittels Enzymimmunoassays Gestagenmetaboliten (im folgenden als Progesteron bezeichnet) in den Faeces der Bären bestimmt. Zunächst für Nutztiere entwickelt, ist dieses Verfahren mittlerweile, zum Teil nach Modifizierung, auch bei vielen Wildtierarten anwendbar (SCHWARZENBERGER et al., 1996).

4.2.1.1. Probengewinnung

4.2.1.1.1. Blutproben

Blutproben wurden bei jeder Ultraschall-Untersuchung von den immobilisierten Bären (14 Braunbären, ein Kragenbär, ein Brillenbär) gewonnen. Hierzu wurde die gestaute Vena cephalica punktiert (Abb. 2). Das Blut wurde in Röhrchen ohne gerinnungshemmende Zusätze aufgefangen. Zur Serumgewinnung wurde nach Gerinnung der Blutkuchen mit einem Glasstab vorsichtig von der Wand des Röhrchens gelöst. Die Proben wurden dann 10 min bei 3000 Umdrehungen/min zentrifugiert (Rotanta/TRC, Hettich, Tuttlingen). Schließlich wurde das überstehende Serum abpipettiert und bis zu seiner Verwendung bei -20°C gelagert.

4.2.1.1.2. Kotproben

Die analysierten Kotproben stammten von 15 Bären (13 Braunbären, ein Kragenbär, ein Brillenbär), wobei von einigen Tieren Proben aus zwei Jahren zur Verfügung standen, so daß insgesamt 17 Progesteron-Profile erstellt werden konnten.

Von elf unbehandelten Bären (zehn Braunbären, ein Kragenbär) wurden kontinuierlich von Anfang September bis zum Beginn der Winterruhe bzw. bis Ende Januar ein- bis dreimal wöchentlich Kotproben gesammelt. Von acht dieser Tiere wurden mehr oder weniger kontinuierlich auch von Februar bis September wöchentliche Kotproben entnommen. Außerdem wurden die Kotproben von sechs Bären (vier Braunbären, ein Kragenbär, ein Brillenbär), die einer Behandlung mit dem Antigestagen J956 und/oder EE_2 unterzogen worden waren, untersucht.

Die Probenentnahme durch die Tierpfleger erfolgte stets zur gleichen Tageszeit. Die Proben wurden unverzüglich bei -20°C tiefgefroren und gelagert. Ihr Transport ins Labor erfolgte tiefgekühlt.



Abb. 2 Blutentnahme aus der V. cephalica antebrachii eines immobilisierten Bären.

4.2.1.2. Aufbereitung der Proben

4.2.1.2.1. Serum

Zur Steroid-Extraktion wurden $100\ \mu\text{l}$ Serum mit 2 ml Petroläther versetzt. Die Proben wurden 30 Minuten geschüttelt (Thys 2, VEB MLW Labortechnik, Ilmenau) und dann bei -70°C tiefgekühlt.

Die flüssige Ätherphase mit den darin gelösten Steroiden wurde abgenommen und evaporiert (Vortex Evaporator, Buchler Instruments). Der Rückstand wurde in 0,4 ml 100% Methanol aufgenommen, kurz erwärmt und mit 0,6 ml Aqua bidest auf 40% Methanol verdünnt. Diese Extrakte wurden bis zu ihrer Verwendung im Enzymimmunoassay bei -20°C gelagert.

Zur Kontrolle wurden Progesteron-freie Seren, denen eine definierte Menge Progesteron zugesetzt worden war, extrahiert.

4.2.1.2.2. Kot

Die Kotproben wurden bei 20°C aufgetaut. 0,5 g Kot wurden mit 4,5 ml 90%igem Methanol versetzt und 30 Minuten geschüttelt. Danach wurden die Proben 10 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert, 1,0 ml des Überstandes abgenommen und im Verhältnis 1:1 mit Aqua bidest verdünnt. Eine Kontrolle der Extraktion wurde durchgeführt, indem Proben, deren Progesteronkonzentration bekannt war, bei jeder Extraktion mitgeführt wurden.

Die Extrakte wurden bis zu ihrer Verwendung ebenfalls bei –20°C gelagert.

Durch Trocknung der verbleibenden Kotprobe wurde ihre Trockenmasse bestimmt.

4.2.1.3. Progesteronbestimmung

Die Progesteronbestimmung erfolgte mit Hilfe eines Enzymimmunoassay (EIA) unter Anwendung der Doppelantikörpertechnik, wie er von PRAKASCH et al. (1987) beschrieben worden ist:

Meerrettichperoxidase- markiertes Progesteron (P₄-3CMO-HRP, IZW) konkurriert mit dem in den Proben enthaltenem Progesteron um die Bindung an den anti-Progesteron Antikörper der Ratte (1. Antikörper; Progesteron-7-BSA, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim). Dieser wird durch einen Schafantikörper gegen Ratten-IgG (2. Antikörper, IZW) an die Mikrotitrationsplatte fixiert. Das Prinzip des durchgeführten Enzymimmunoassays ist schematisch in Abb. 3 dargestellt.

Angaben zur Spezifität des kommerziell erhältlichen ersten Antikörpers finden sich in Tab. 2.

Tab. 2 Kreuzreaktionen des verwendeten anti-Progesteron IgG der Ratte

Antigen	Kreuzreaktion (%) mit dem verwendeten P4-Antikörper
5 β Pregnan 3α, 20α diol (Pregnandiol)	<0,1
4 Pregnen 20α ol 3one (20α)	<0,1
5α Pregnan 3β ol 20one (5α 20 one)	18
5β Pregnan 3α ol 20 one (5β 20 one)	<0,1
4 Pregnen 3,20 dion (Progesteron; P4)	100
5α Pregnan 3,20 dion (P3-O)	31
5α Pregnen 3α ol 20one (P3-OH)	<0,1
5α Pregnan 20α ol 3one (5α 20β ol 3one)	<0,1
5α Pregnan 3β 20α diol (5α 3β 20α diol)	<0,1
5α Pregnan 3α, 20α diol (5α 3α 20α diol)	<0,1
J956	<0,1

4.2.1.3.1. Beschichtung der Platten

Die Mikrotitrationsplatten (F96, Nunc, Wiesbaden) wurden mit affinitätsgereinigtem Anti-Ratten-IgG aus dem Schaf beschichtet. In jede Vertiefung der Platte wurde 1 µg IgG, gelöst in 100 µl Coating-Puffer (4,29 % Na₂CO₃ x 10 H₂O, 2,39 % NaHCO₃, pH 9,6), gegeben; die Platten wurden 2 Stunden bei 20°C inkubiert. Danach wurden die unspezifischen Bindungen mit 300 µl Testpuffer (20 mM Tris-HCL, 1,5 mM EDTA, 0,3 M NaCl, pH 7,2, 0,1% RSA) für 15 bis 45 min bei ca. 20°C abgesättigt. Nach Entleerung wurden die Platten bei -25°C gelagert. Vor ihrer Verwendung wurden sie einmal mit 300 µl 0,05 %iger Tween 80-Lösung im automatischen Washer (96 PW; SLT, Crailsheim) gewaschen.

4.2.1.3.2. Durchführung des Enzymimmunoassays

Mit Hilfe eines automatischen Diluters (Micro lab +1000, Hamilton, Darmstadt) wurden in einem Arbeitsschritt 100 µl einer Lösung von HRP-markiertem Progesteron und 20 µl Standard (0,2-100 pg/20 µl Progesteron) bzw. Probelösung (jeweils als Doppelbestimmung) pro Vertiefung der Mikrotitrationsplatte dispensiert. Anschließend wurden 100 µl einer Verdünnung des ersten Antikörpers hinzugefügt.

Die so beschickten Platten wurde bei 6 bis 8°C über Nacht inkubiert, wobei die Fixierung der Progesteron-Antikörper und die kompetitive Immunreaktion gleichzeitig stattfanden.

Am folgenden Tag wurde die Platten viermal mit 300 µl 0,05 %iger Tween 80-Lösung im automatischen Washer gewaschen, um ungebundene Steroide zu entfernen. Nach Temperierung auf 25°C wurden 150 µl der Substratlösung (0,01 % Tetramethyl-Benzidin + 0,004 % H₂O₂ in 100 mM Na-Acetat-Lösung, mit Zitronensäure auf pH 5,5 eingestellt) pro Loch dispensiert. Danach wurden die Platten lichtgeschützt und unter leichtem Schütteln bei 25°C inkubiert (Inkubator 1092, GFL, Burgwedel). Zum Abstoppen der Enzymreaktion wurden nach 40 min 50 µl 4 M H₂SO₄ zugegeben.

Die optische Dichte nach dem enzymatischen Umsatz der Substratlösung wurde bei 450 nm im Mikrotitrationsplattenleser (Spectra Fluor, SLT-Tecan, Crailsheim) gemessen und die Progesteronkonzentrationen anhand einer Standardkurve bestimmt. Überschritten die ermittelten Werte den Maximalbereich der eingesetzten Standardkurve, wurde eine weitere Verdünnung der Extrakte erforderlich.

Die einzelnen Schritte sind gemeinsam mit einer schematischen Darstellung des Enzymimmunoassays noch einmal in Abb. 3 zusammengefaßt.

4.2.1.3.3. Validierung des EIA

Zur Validierung des Assays wurden der Inter- und Intraassay-Variationskoeffizient bestimmt. Hierzu wurden zwei Proben mit bekannten Progesteronkonzentrationen auf jeder verwendeten Platte jeweils als Doppelbestimmung mitbestimmt (Interassay) bzw. auf einer Platte wiederholt eingesetzt (Intraassay). Die errechneten Variationskoeffizienten betragen für den Interassay 10,39 % bzw. 20,56 % und für den Intraassay 5,0 % bzw. 4,1%.

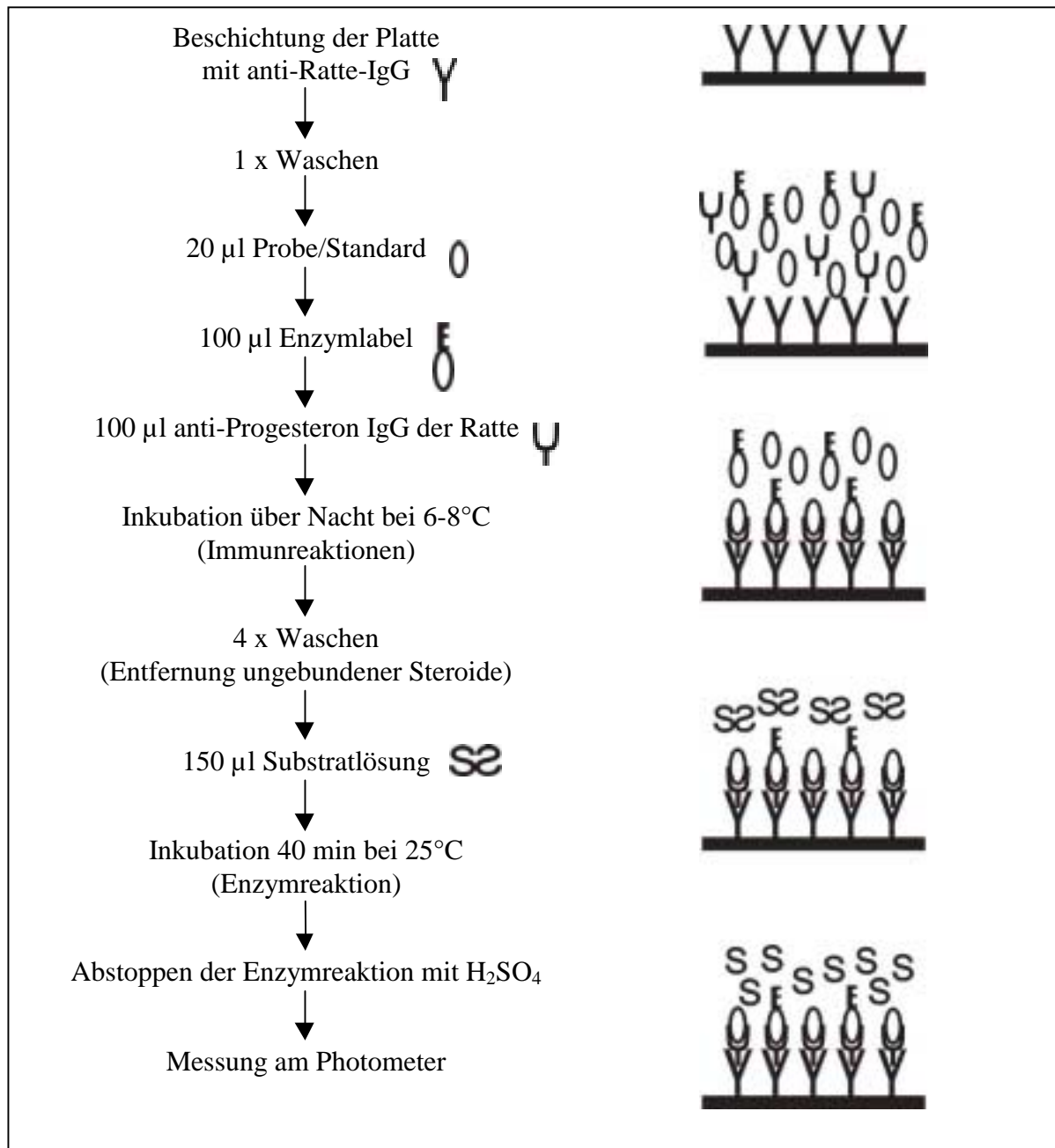


Abb. 3 Arbeitsschritte und schematische Darstellung des angewendeten Enzymimmunoassays zur Bestimmung von Progesteronkonzentrationen.

4.2.2. Ultrasonographische Untersuchungen

4.2.2.1. Untersuchungstermine

Insgesamt wurden 60 Ultraschall-Untersuchungen an Bären vor und nach Behandlung sowie an trächtigen und nicht trächtigen Kontrolltieren durchgeführt. Diese teilen sich wie folgt auf: Vier Braunbären wurden im Frühjahr untersucht (ein Bär im Mai, drei im Juni). 20 Untersuchungen wurden im September/Oktober (vor potentieller Implantation), 36 Untersuchungen im November/Dezember (nach potentieller Implantation) durchgeführt.

Die Untersuchungstermine sind im Einzelnen in Anhang 2 aufgeführt.

4.2.2.2. Immobilisation

Die Immobilisation der Braunbären und des Kragenbären erfolgte durch die intramuskuläre Distanzinjektion einer Kombination aus $17,8 \pm 2,25$ $\mu\text{g}/\text{kg}$ Körpermasse (KM) Etorphin und 79 ± 10 mg/kg KM Acepromazin (Large Animal Immobilon®, C-Vet Ltd, Bury St Edmunds) sowie 20 mg/Tier Xylazin (Rompun®, Bayer) mit Hilfe einer Injektionspistole (PiCO₂, Dan-Inject, Gelsenkirchen).

Nach Beendigung der Untersuchung wurde das Etorphin mit Diprenorphin (2,67 $\text{mg}/1$ mg Etorphin; Revivon®, C-Vet LTD, Bury St Edmunds) und das Xylazin mit Atipamezol (1 $\text{mg}/2$ mg Xylazin; Antisedan®, Pfizer, Karlsruhe) antagonisiert.

Ein Braunbär, der auf vorherige Immobilon-Narkosen mit einem sehr langen Nachschlaf reagiert hatte, wurde zur Vermeidung von Komplikationen mit einer Kombination aus 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KM Medetomidin (Domitor®, Pfizer, Karlsruhe) und 3 mg/kg KM Ketamin (Ketamin 10%®, WDT, Garbsen) immobilisiert. Die Wirkung des Medetomidins wurde mit 0,45 mg/kg KM Atipamezol, davon 0,3 mg i.m. und 0,15 mg s.c., antagonisiert.

Die Brillenbärin wurde bei der ersten Untersuchung mit 2,3 mg/kg Ketamin und 3,3 mg/kg Xylazin immobilisiert, wobei allerdings mit 0,3 mg/kg Xylazin, 0,3 mg/kg Ketamin und 5,6 μg Medetomidin nachdosiert werden mußte. Die zweite und dritte Immobilisation wurden mit 2,5 ml/Tier Hellabrunner Mischung, das entspricht 3,6 mg/kg Xylazin und 2,8 mg/kg Ketamin, problemlos durchgeführt.

Die durchschnittliche Dauer der Immobilisationen betrug 45 Minuten. Komplikationen traten in zwei Fällen auf: Eine mit Immobilon/Xylazin immobilisierte 24-jährige Braunbärin starb aufgrund einer Atemdepression mit anschließendem Herzstillstand trotz sofortiger Antidot-Gabe und wiederbelebender Maßnahmen [Injektion von Doxapram (Dopram®, Albrecht, Aulendorf) und Adrenalin (Adrenalin 1:1000, Jenapharm, Jena) Herzdruckmassage]. Bei einer anderen Braunbärin setzte unmittelbar nach Narkoseeintritt die Atmung aus, so daß ihr ohne eine Untersuchung durchführen zu können das Antidot injiziert werden mußte.

4.2.2.3. Transrektale Ultraschalldiagnostik

Die anatomischen Gegebenheiten beim Bären [Größe des Tieres, Größe und Lage der Genitalorgane, Fetteinlagerungen insbesondere zur Winterruhe (Abb. 4)] erschweren bzw. verhindern die Darstellung der Genitalorgane mittels transcutanem Ultraschall. Zwar beschreiben TSUBOTA (1990) und HELLGREN et al. (1990) die Diagnose von fortgeschrittenen Trächtigkeiten beim Braunbären mittels transabdominalem Ultraschall, die Darstellung von nicht bzw. früh gravidem Uterus und Ovarien gelingt jedoch nur mittels transrektalem Ultraschall (GÖRITZ et al., 1997).

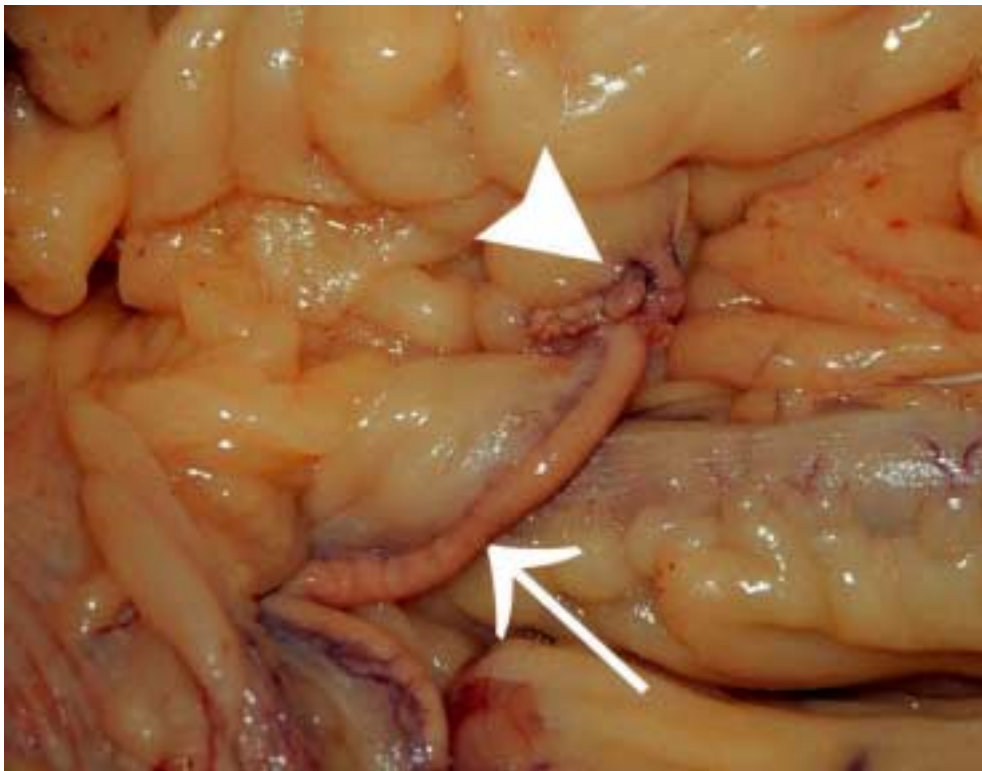


Abb. 4 Uterus (↑) und Ovar (➤) einer Kragenbärin, umgeben von Fettgewebe; in situ.

Hierzu wurde ein portables Ultraschallgerät (CS 9100 Oculus, Picker International GmbH; Espelkamp), ausgestattet mit einem intraoperativen 7,5 MHz Konvex-Schallkopf (EUP-F334, 40R Fingertip, Abb. 5), verwendet. Für diesen Schallkopf wurde am IZW ein spezieller Adapter entwickelt (HILDEBRANDT und GÖRITZ, 1995; GÖRITZ, 1996), der ein atraumatisches Führen des Schallkopfes im Rektum bis zu einer Tiefe von 50 cm ermöglicht (Abb. 5).

Nach Ausspülung von Kot aus dem Enddarm mittels körperwarmen Wassers wurde der Schallkopf unter Verwendung von Ultraschallgel (Aquasonic®, Orange, NJ, USA) in das Rektum eingeführt. Nun wurden unter vorsichtigem Vorschieben des Schallkopfes nacheinander Vagina, Cervix, Uterus und Ovarien aufgesucht, ihr maximaler Durchmesser vermessen und ihre Struktur beurteilt (Abb. 6).



Abb. 5 Im Adapter fixierter 7,5 MHz Mikrokonvex-Schallkopf.



Abb. 6 Transrektale Ultraschall-Untersuchung einer Kragenbärin.

Darüber hinaus konnten auch Analdrüsen, Blase und Blasen Hals, Nieren, Nebennieren und u. U. (abhängig von der Größe des Tieres) auch Leber und Milz dargestellt und auf pathologische Veränderungen untersucht werden.

Alle Ultraschalluntersuchungen wurden mit einem professionellem Super-VHS Videorecorder (9100 SVO-P, Sony, Köln) auf S-VHS Videokassetten aufgezeichnet, so daß die Untersuchungen archiviert und für spätere Auswertungen genutzt werden konnten.

4.2.3. Pharmakologische Untersuchungen

Untersucht wurde die Wirksamkeit des Antigestagens J956 Carbamat (kurz: J956), das von der Firma Jenapharm, Jena, zur Verfügung gestellt wurde, und des Östrogens Ethinylestradiol (EE₂; Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) zum Trächtigkeitsabbruch in Bären.

Bei dem Antigestagen J956 handelte es sich chemisch um 11 β -{4-[(Ethylaminocarbonyl)-oximinomethyl]-phenyl}-17 β -methoxy-17 α -methoxymethyl-estra-4,9-dien-3-one (s. Abb.1).

Nachdem in vorangegangenen Untersuchungen die relative Bindungsaffinität des Antigestagens J912, das chemisch eng verwandt mit J956 ist, an den endometrialen Progesteronrezeptor von Bären bestimmt worden war (JEWGENOW und MEYER, 1998), wurden an Schwarz- und Braunbären Untersuchungen zur Pharmakokinetik und Bioverfügbarkeit von J956 sowie eine klinische Studie zur Wirksamkeit von J956 und EE₂ durchgeführt.

4.2.3.1. Bestimmung der Halbwertszeit und Bioverfügbarkeit von J956

Bioverfügbarkeit und Halbwertszeit des Antigestagens J956 wurden ermittelt, indem nach oraler und parenteraler Applikation Serumproben gewonnen (s. Kapitel 3.1.1.1) und die Konzentrationen des Antigestagens in diesen Proben bestimmt wurden.

Die Schwarzbärin „Mira“ konnte in einem Zwangskäfig mechanisch so fixiert werden, daß über einen begrenzten Zeitraum die wiederholte Gewinnung von Blutproben ohne Sedation möglich war. Bei den übrigen Bären konnte die Blutentnahme nur in Narkose erfolgen, so daß die Probengewinnung auf die zwei Termine, an denen Ultraschall-Untersuchungen durchgeführten wurden, beschränkt wurde (eine Nullprobe vor Applikation, eine Probe nach Applikation).

4.2.3.1.1. Orale Applikation von J956

In zwei Versuchsreihen wurde dem weiblichen Schwarzbären „Mira“ (ca. 100 kg KM) das in Gelatinekapseln abgefüllte Antigestagen J956 an vier aufeinanderfolgenden Tagen mit dem Lieblingsfutter verabreicht (Tab. 3). Am vierten Tag der zweiten Versuchsreihe mißlang allerdings die Applikation des Antigestagens, da das Tier die Futterraufnahme verweigerte.

Tab. 3 Versuchsaufbau zur Bestimmung der J956-Serumkonzentrationen nach oraler Applikation.

Applikation			Probengewinnung (Uhrzeit)
Tag	Dosis (mg/kg KM)	Uhrzeit	
1	1	10 ⁰⁰	8 ⁰⁰ ¹⁾ 16 ⁰⁰
2	1	10 ⁰⁰	8 ⁰⁰ 16 ⁰⁰
3	5	10 ⁰⁰	8 ⁰⁰ 16 ⁰⁰
4	5 ²⁾	10 ⁰⁰	8 ⁰⁰ 16 ⁰⁰

¹⁾ Nullprobe

²⁾ in der zweiten Versuchsreihe mißlungen

4.2.3.1.2. Parenterale Applikation von J956

Zur parenteralen Applikation wurde das Antigestagen unmittelbar vor der Injektion im Ultraschallbad bei 70°C in 100%igem Ethanol (1 ml/g J956) gelöst und anschließend mit Ricinusöl (1,5 ml/g J956) auf eine gewebeverträgliche Alkoholkonzentration verdünnt. Diese Lösung mußte innerhalb von 15 Minuten injiziert werden, um ein Ausfallen von J956 noch in der Spritze bzw. im Injektionspfeil zu vermeiden.

Der Schwarzbärin „Mira“ wurden einmalig 10 mg/kg J956 intramuskulär appliziert. Um den Verlauf des Serumspiegels von J956 zu verfolgen, wurden über einen Zeitraum von zwei Monaten an Tag 1, 2, 3, 4, 7, 9, 11, 30 und 60 jeweils zur gleichen Tageszeit (11⁰⁰ Uhr) Blutproben entnommen (Tab. 4).

Darüber hinaus wurde Blut von vier Braunbären und einem Brillenbären, denen im Rahmen der klinischen Studie ebenfalls 10 mg/kg J956 einmalig intramuskulär injiziert worden waren, jeweils vor und einmal nach der Applikation gewonnen, wobei der Abstand zwischen Applikation und zweiter Blutentnahme variiert wurde (Tab. 4).

Tab. 4 Versuchsaufbau zur Bestimmung der J956-Serumkonzentrationen nach parenteraler Applikation.

Tier	Blutprobe (Tage nach Applikation von 10 mg/kg J956)
Mira	1-4, 7, 9, 11, 30, 60
Inca	2
Bianca	6
Olga	21
Helle	29
Dunkle	29

4.2.3.1.3. Aufbereitung der Serumproben

Ein ml Serum wurde mit 4 ml tertiärem Butylmethyläther/Petroläther (30/70) versetzt und 30 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Diese Proben wurden bei -70°C tiefgefroren; die flüssige Ätherphase wurde dekantiert und anschließend evaporiert. Der Rückstand wurde in 1 ml 40% Methanol aufgenommen.

500 μl dieser Extrakte wurden mittels Hochdruck-Flüssigchromatographie (HPLC, Kontron Instruments) über eine C18-Säule (250x4 mm, 6 μ) mit 75% Methanol aufgetrennt (Fließgeschwindigkeit 1 ml/min). Von Minute sechs bis neun wurden alle 30 Sekunden Fraktionen von jeweils 500 μl gesammelt. Diese sechs Fraktionen wurden nachfolgend im Rezeptor-Bindungs-Assay eingesetzt.

4.2.3.1.4. Durchführung des Kompetitiven Rezeptor-Bindungsassays

Zur Bestimmung der J956-Konzentrationen im Serum wurde der von MEYER et al. (1988) etablierte kompetitive Rezeptor-Bindungsassay modifiziert.

Es wurde porciner Progesteronrezeptor verwendet, da die Uteri von Schweinen in ausreichender Menge von einem örtlichen Schlachthof bezogen werden konnten.

Die Konzentration des endometrialen Progesteronrezeptors ist während der Follikelphase des Zyklus am höchsten (MEYER et al, 1988). Daher wurden nur die Uteri von Schweinen, auf deren Ovarien sich Follikel, aber keine aktiven Corpora lutea befanden, unmittelbar post mortem in Alufolie verpackt und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.

Im Labor wurden sie bei 0 bis 4°C langsam aufgetaut. Das Endometrium wurde frei präpariert, mit einer vierfachen Menge TEDG-Puffer (10 mM TRIS-HCL, 1,5 mM EDTA, 3 mM DTT, pH 7,6, Glycerol 90/10 v/v) versetzt und bei 0 bis 4°C homogenisiert (Ultra Turrax T25,

IKA, Staufen i. Br.). Anschließend wurde das Homogenisat bei 0°C ultrazentrifugiert (1 Stunde bei 280.000 x g; XL-70 Ultracentrifuge, Beckmann, Palo Alto/USA) und der den Progesteron-Rezeptor enthaltende Überstand, im folgenden als Zytosol bezeichnet, abgenommen. Bis zu seiner weiteren Verwendung konnte das Zytosol bei -70°C gelagert werden.

Im kompetitiven Rezeptor-Bindungsassay konkurrierten J956 und ein zweiter, radioaktiv-markierter Progesteron-Antagonist ($[^3\text{H}]\text{-ORG}$, Amersham, Braunschweig) um die Bindung an den porcinen Progesteronrezeptor. Der Ablauf des Testes ist schematisch in Abb. 7 dargestellt. Im einzelnen wurde der Rezeptor-Assay folgendermaßen durchgeführt:

500 μl der mittels HPLC aufgetrennten sechs Fraktionen jeder Serumprobe wurden mit 20 μl $[^3\text{H}]\text{-ORG}$, eingestellt auf eine Aktivität von ca. 15.000 counts per minute (cpm), versetzt und evaporiert. Anschließend wurde dem Rückstand 500 μl Cytosol (eingestellt auf eine nicht-spezifische Bindung von ca. 11000 cpm/500 μl) hinzugegeben und das Gemisch über Nacht bei 0°C inkubiert.

Am folgenden Tag wurden ungebundene Steroide durch Zugabe von 200 μl ml einer Aktivkohle-Lösung (2% Norit A, 0,2% Dextran T70) ausgefällt. Nach 10-minütiger Zentrifugation mit 3000 Umdrehungen/min wurden 500 μl ml des Überstandes 2,5 ml Xylofluor (J. T. Baker, Deventer/ Niederlande), ein Szintillationsverstärker, zugefügt, und die Szintillation dieser Proben wurde am Szintillationszähler gemessen.

Parallel wurden jeweils 20 μl der Standards (4-1000 ng/ml J956), die Nullprobe (20 μl 40% Methanol) sowie eine Probe zur Bestimmung der Totalaktivität (20 μl 40% Methanol, Ausfällung ungebundener Steroide mit Aktivkohle entfiel) in den Test eingesetzt.

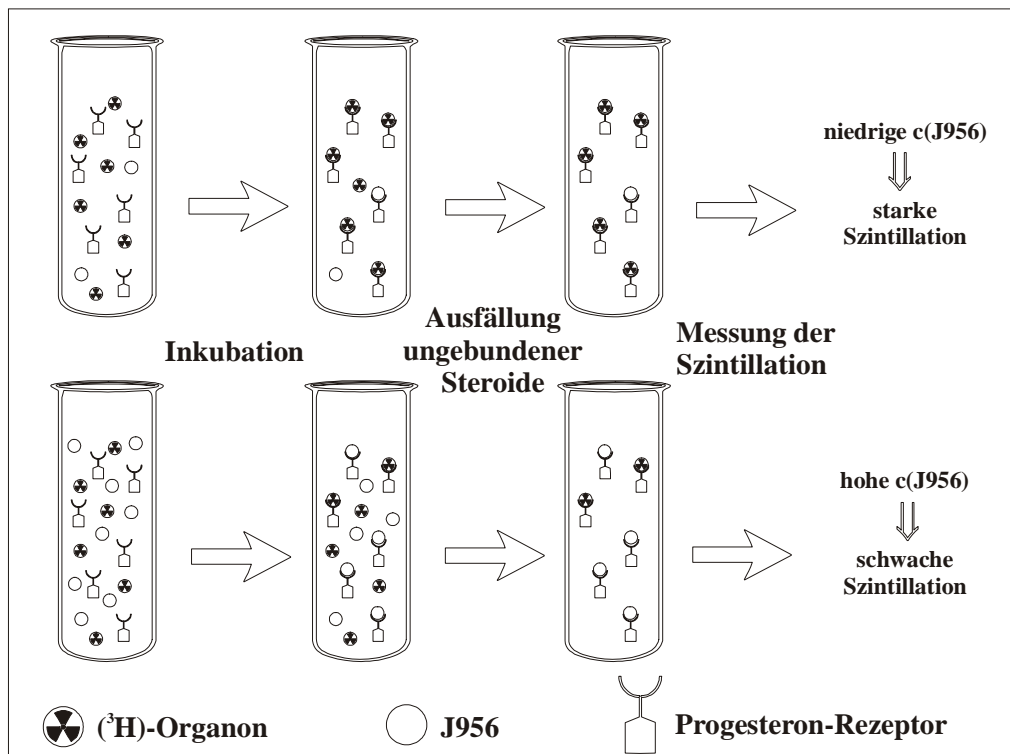


Abb. 7 Schematische Darstellung des kompetitiven Rezeptor-Bindungsassays.

An der Standardkurve (Abb. 8) konnten die Konzentrationen in den einzelnen Fraktionen abgelesen werden. Nachweisbare Mengen von J956 fanden sich nur in den mittleren vier der sechs gesammelten Fraktionen. Durch Addition der ermittelten Werte dieser vier Fraktionen jeder Serumprobe und unter Berücksichtigung des eingesetzten Probenvolumens wurden die Serumkonzentrationen in ng/ml berechnet.

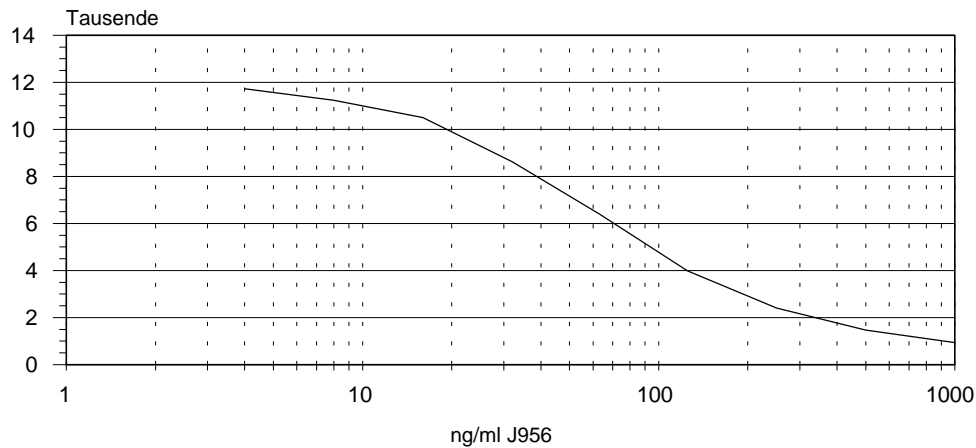


Abb. 8 Im kompetitiven Rezeptor-Bindungsassay ermittelte Standardkurve von J956.

Die Validierung von Serumextraktion, chromatographischer Trennung und kompetitivem Rezeptor-Bindungsassay erfolgte folgendermaßen: Zum einen wurden dem Serum eines unbehandelten Bären verschiedenen Mengen J956 zugefügt (Endkonzentration 10, 15, 20, 40, 80, 100, 200, 400 ng/ml). Diese Serumproben wurden genauso extrahiert, aufgetrennt und im Rezeptorassay eingesetzt wie oben beschrieben; aus den ermittelten Konzentrationen wurden die Wiederfindungsraten bestimmt (Tab. 5). Sie betragen im Mittel $76,7 \pm 3,1\%$.

Zum anderen wurden, um die Trennung von J956 und Progesteron über die HPLC zu verifizieren und eine Kreuzreaktion beider Steroide im Rezeptor-Bindungsassay auszuschließen, unter Umgehung des Extraktion-Schrittes Lösungen von jeweils 10 und 100 ng/ml Progesteron und J956 in 40%igem Methanol unter gleichen Bedingungen wie oben beschrieben chromatographisch aufgetrennt. Die gleichen sechs Fraktionen, die zur Bestimmung der Serumkonzentrationen von J956 verwendet wurden, wurden im Assay eingesetzt.

In diesen jeweils sechs Fraktionen der beiden Progesteron-Lösungen konnten keine Gestagene, in den mittleren vier der je sechs Fraktionen der J956-Lösungen hingegen 92,4% (10 ng/ml) bzw. 94,8% (100 ng/ml) des Antigestagens nachgewiesen werden. Es konnte somit ausgeschlossen werden, daß Progesteron und J956 bei der chromatographischen Trennung in gleichen Fraktionen erscheinen und es im Rezeptor-Bindungsassay zu einer Kreuzreaktion beider kommt.

Tab. 5 Wiederfindungsraten von J956-Konzentrationen im Rezeptor-Bindungsassay.

Eingesetzte Konzentration (ng/ml)	Ermittelte Konzentration (ng/ml)	Wiederfindungsrate (%)
10	7,48	74,8
15	11,28	75,2
20	15,5	77,5
40	31,2	78
80	49	61,25
100	82,8	82,8
200	175,2	87,6

4.2.3.2. Klinische Studie zur Effektivität von J956 und/oder EE₂

Die Versuche, durch Applikation von J956 und/oder EE₂ einen schonenden Trächtigkeitsabbruch im periimplantativen Zeitraum zu erzielen, umfaßten insgesamt einen Zeitraum von sechs Jahren. Dosierung, Applikationsart, Zeitpunkt der Applikation und Kombination der beiden Präparate wurden variiert.

Der Behandlung ging in der Regel eine Ultraschalluntersuchung voraus (nicht im zweiten und fünften Jahr), um den Reproduktionsstatus der Bären zu bestimmen und gesunde und potentiell tragende Tiere zu selektieren.

Die Behandlungsergebnisse und mögliche Nebenwirkungen wurden ultrasonographisch kontrolliert und dokumentiert. Diese Kontrolluntersuchungen wurden Ende November/Anfang Dezember durchgeführt, da zu diesem Zeitpunkt die Implantation der Embryonen nach Literaturangaben sicher stattgefunden haben sollte. Aus logistischen Gründen wurden in einem Jahr keine Nachuntersuchungen durchgeführt. Die Kontrolluntersuchung der Bärin „Bianca“ nach parenteraler Gabe von EE₂ konnte aufgrund von Komplikationen bei der Narkose nicht durchgeführt werden.

Darüber hinaus wurde der Genitaltrakt der Braunbärin Panja, die am 16.12. in der Narkose gestorben war, entnommen, vermessen und makroskopisch auf pathologische Veränderungen untersucht.

4.2.3.2.1. Orale Applikation vor Implantation

Sechs Bären sollte an vier aufeinanderfolgenden Tagen eine Kombination aus J956 und EE₂ oral appliziert werden. Hierzu wurden die in Gelatinekapseln gefüllten Präparate den Bären mit dem Lieblingsfutter angeboten, wobei die Dosis von J956 und EE₂ variiert wurde. Die Versuchsansätze sind in Tab. 6 dargestellt.

Tab. 6 Versuchsansatz zur Untersuchung der Wirksamkeit einer oraler Applikation von J956 in Kombination mit EE₂ vor Implantation.

Tier	Dosierung/kg		Behandlung	US-Untersuchungen
	mg J956	µg EE ₂		
Mascha	4x 1	4x 100	21.10.96	-
Bianca	4x 1	4x 100	21.10.96	-
Mascha	4x 2	4x 10	27.-30.10.97	09.09., 02.12.
Panja	4x 2	4x 10	27.-30.10.97	23.09., 24.11.
Olga	4x 2	4x 10	27.-30.10.97	23.09., 24.11.
Vroni	4x 2	4x 10	27.-30.10.97	23.09., 24.11.

4.2.3.2.2. Parenterale Applikation vor Implantation

Acht Behandlungen (sieben Braunbären, ein Brillenbär) wurden ausschließlich mit J956, neun Behandlungen (sieben Braun-, ein Kragen- und ein Brillenbär) ausschließlich mit EE₂ und drei Behandlungen mit einer Kombination beider Wirkstoffe durchgeführt (Tab. 7). Die Behandlung bestand aus einer einmaligen intramuskulären Injektion entweder aus der Hand oder mittels Injektionspistole, wozu J956 jeweils vor Ort in der in 3.3.2.1.2 beschriebenen Weise aufzulösen war. Von EE₂ konnte eine stabile alkoholische Lösung injiziert werden.

Nur der Brillenbärin „Inca“ wurde im ersten Jahr ihrer Versuchsteilnahme die Kombination dreimalig jeweils im Abstand von sechs Wochen appliziert, da bei Brillenbären der Implantationszeitpunkt wesentlich variabler als bei Braun- oder Kragenbären und somit zeitlich schwer zu determinieren ist. In den folgenden Jahren wurde auch bei ihr die Behandlung auf eine einmalige Applikation beschränkt.

Bei einer Braunbärin erfolgte die Injektion von 2,5 mg/kg J956 und 5 µg/kg EE₂ nach teilweise mißlungener oraler Applikation, ohne daß ihr Reproduktionsstatus zuvor untersucht werden konnte.

Tab. 7 Versuchsansatz zur Untersuchung der Effektivität einer parenteralen (intramuskulären) Applikation von J956 und/oder EE₂ vor Implantation

Tier	Dosierung/kg		Behandlung	Untersuchungen
	mg J956	µg EE ₂		
Mascha	2,5	5	11.11.96	-
Bianca	10	10	20.10.98	20.10., 03.12.
Inca	10	10	03.09.98	03.09.
	10	10	16.10.98	
	10	5	30.11.98	02.12.
Gisela	-	10	20.10.98	20.10.+ 02.12.
Mascha	-	10	22.10.98	22.10.+ 03.12.
Bianca	-	10	20.10.99	-
Mascha	-	10	20.10.99	29.11.
Gisela	-	10	21.10.99	29.11.
Helle	-	10	21.10.99	30.11
Alte	-	10	21.10.99	30.11.
Brauni	-	10	22.10.99	02.12.
Inca	-	10	11.10.99	17.11.
Bianca	1		28.09.95	28.09., 04.12.
Mascha	1		29.09.95	29.09., 05.12.
Panja	10	-	22.10.98	22.10., 16.12.
Olga	10	-	22.10.98	22.10., 16.12.
Bianca	7,5		19.10.00	12.12.
Helle	7,5		23.10.00	28.11.
Alte	7,5		23.10.00	28.11.
Inca	7,5		20.10.00	05.12.

4.2.3.2.3. Parenterale Applikation nach Implantation

Sechs Braunbären wurden nach ultrasonographischem Trächtigenachweis behandelt. Einem Bären wurde nur J956, den fünf übrigen Tieren eine Kombination aus J956 und EE₂ appliziert.

Die Dosierungen und Behandlungszeitpunkte sind in Tab. 8 aufgeführt.

Tab. 8 Versuchsansatz zur Untersuchung der Effektivität einer parenteralen (intramuskulären) Anwendung von J956 und/oder EE₂ nach Implantation.

Tier	Dosierung/kg		Behandlung	Untersuchungen
	mg J956	µg EE ₂		
Brauni	10	-	01.12.98	01.12.
Panja	6,5	10	09.12.97	17.06., 23.09., 24.11.
Mascha	6,5	10	02.12.97	09.09., 02.12.
Alte	10	10	13.11.98	13.11., 12.12.
Helle	10	10	13.11.98	13.11., 12.12.
Dunkle	10	10	13.11.98	13.11., 12.12.

4.2.4. Statistik

Die arithmetischen Mittel und Standardabweichungen der endokrinologisch und ultrasonographisch ermittelten Werte wurden mit Hilfe des Software-Programms Excel 97 (Microsoft®, Corp.) berechnet. Zur Überprüfung von Signifikanzen bei Konzentrations- und Größenänderungen im Jahresverlauf wurde der t-Test für abhängige Stichproben angewendet. Das Signifikanzniveau wurde bei $p < 0,05$ festgelegt.