

Aus der
Hauptabteilung
Non Clinical Drug Safety
der Bayer-Schering-Pharma AG,
Berlin

**WIRKUNG VON
LEVONORGESTREL AUF DEN
OVARIALZYKLUS VON
GÖTTINGER MINISCHWEINEN**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Grades
Doktor der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Arn Tellmann
Tierarzt aus Bielefeld
Berlin 2008

Journal-Nr.: 3205

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. L. Brunnberg
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. H. Fink
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. C. Hegele-Hartung
Dritter Gutachter: Prof. Dr. K.-H. Lahrmann

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

Pigs, miniature pigs, laboratory animals, progesterone, steroid hormones,
synthetic progestogens, ovulation, animal behaviour, ultrasonography, ovary,
endometrium, histology, LH, FSH, estradiol, quantitative analysis,
pharmacokinetics

Tag der Promotion: 26.06.2008

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen
Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über
<<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

ISBN-13: 978-3-86664-430-4 (3-86664-430-2)

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2007
D188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder
Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in
irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet,
vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch
ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der
Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von
jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written
authorization of the publisher.

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© mbv 2008

Nordendstr. 75 - 13156 Berlin – 030-45494866
verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Meinen Eltern

1	EINLEITUNG	1
2	LITERATURÜBERSICHT	3
2.1	Sexualsteroidoide und ihre Wirkungsmechanismen	3
2.2	Sexualzyklus	5
2.3	Pharmakologie der Gestagene.....	9
2.4	Pharmakologische Testmodelle zur Charakterisierung von Gestagenen.....	10
2.5	Synthetische Gestagene und ihre Anwendungsgebiete	11
2.6	Levonorgestrel.....	15
2.7	Das Göttinger Minischwein	17
3	MATERIAL UND METHODEN.....	20
3.1	Tiere, Versorgung und Haltungsbedingungen.....	20
3.2	Methoden	20
3.2.1	Duldungsreflex	20
3.2.2	Rötung/Schwellung der Vulva	21
3.2.3	Bildung von Vaginalsehlim	21
3.2.4	Vaginalzytologie	21
3.2.5	Ultraschalluntersuchung von Ovar und Uterus	22
3.2.6	Bestimmung der endogenen Hypophysen- und Ovarhormonkonzentrationen.....	22
3.2.7	Levonorgestrel-Bioanalytik.....	24
3.2.8	Gerinnungsphysiologische, hämatologische und klinisch-chemische Untersuchungen, Protein-Elektrophorese.....	25
3.2.9	Bestimmung des Futtermittelsverbrauchs und der Körpergewichte	28
3.2.10	Postmortale Untersuchungen.....	29
3.3	Studiendesign.....	32
3.3.1	Vorstudie	32
3.3.2	Hauptstudie	33
3.4	Statistik	35
4	ERGEBNISSE	36
4.1	Vorversuch.....	36
4.1.1	Duldungsreflex	36
4.1.2	Rötung/Schwellung der Vulva	37
4.1.3	Bildung von Vaginalsehlim	38
4.1.4	Vaginalzytologie	39
4.1.5	Ultraschalluntersuchung von Ovar und Uterus	39
4.1.6	Bestimmung der Hypophysen- und Ovarhormonkonzentrationen	40
4.2	Hauptversuch	47
4.2.1	Duldungsreflex	47
4.2.2	Rötung der Vulva	50
4.2.3	Schwellung der Vulva	51
4.2.4	Bildung von Vaginalsehlim	52
4.2.5	Ultraschalluntersuchung des Ovars	55

4.2.6	Bestimmung der endogenen Hypophysen- und Ovarhormonkonzentrationen.....	56
4.2.7	Levonorgestrel-Bioanalytik.....	72
4.2.8	Gerinnungsphysiologische, hämatologische und klinisch-chemische Untersuchungen.....	76
4.2.9	Futtermverzehr/Körpergewichte	76
4.2.10	Postmortale Untersuchungen.....	77
5	DISKUSSION	88
5.1	Beurteilung der Methoden des Vorversuches	88
5.1.1	Duldungsreflex.....	88
5.1.2	Rötung/Schwellung der Vulva	89
5.1.3	Bildung von Vaginalsehlein	90
5.1.4	Vaginalzytologie	90
5.1.5	Ultraschalluntersuchung.....	90
5.1.6	Bestimmung der endogenen Hormonkonzentration	91
5.1.7	Zusammenfassung.....	92
5.2	Beurteilung der Ergebnisse des Hauptversuches	93
6	SCHLUSSFOLGERUNG.....	97
7	ZUSAMMENFASSUNG	98
8	SUMMARY	99
9	LITERATURÜBERSICHT	100
10	ANHANG	108
10.1	Vorversuch.....	108
10.1.1	Einzelwerte.....	108
10.2	Hauptversuch	111
10.2.1	Einzelwerte.....	111
11	DANKSAGUNG.....	133

Abkürzungen:

AAI	Applied Analytical Industry
ALB	Albumin
ALP	Alkalische Phosphatase
ALT	Alanin-Aminotransferase
Animax-ICI	Methallibure
Appl. Vol.	Applikationsvolumen
APTT	aktivierte partielle Thromboplastinzeit
AR	Androgen-Rezeptor
AST	Aspartat-Aminotransferase
AUC	Area under the curve
BASC	Basophile Leukozyten
BUN	Harnstoff-Stickstoff
BV [%]	Bioverfügbarkeit in Prozent
Ca	Kalzium
CA	Corpus albicans
CAS	Chemical Abstract Service
cAMP	cyclisches Adenosin Monophosphat
CHOL	Cholesterin
	Cholesterol Oxidase Phenol 4-Aminoantipyrene
CHOL-PAP	Peroxidase
CK	Creatinkinase
Cl	Chlorid
CL	Corpus luteum
CL 2	Corpus hämorrhagicum/rubrum
CL 3	Regressionskörper
cm	Zentimeter
C _{max}	maximale Konzentration
CREA	Creatinin
CV	overall precision
°C	Grad Celsius
D	Diestrus
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DR	Duldungsreflex
E	Endometrium
ES	Estrus
E2	17-β-Estradiol
ED50	mittlere Wirkdosis
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMEA	European Agency for the Evaluation of Medicinal Products
EOC	eosinophile Leukozyten
ER	Estrogen-Rezeptor
FI	Fibrinogen
fL	Femtoliter
fmol	Femtomol
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
g	Gramm
GGT	Gamma-Glutamyl-Transferase
GLDH	Glutamat-Dehydrogenase
GLU	Glukose
GM	Göttinger Minischwein
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung

Abkürzungen (Fortsetzung):

GnRH	gonadotropes Releasing Hormon
GR	Gestagen Rezeptor
h	Stunde
HCG	Human Chorionic Gonadotropin
HE	Hämatoxylin-Eosin
HGB	Hämoglobin
HRE	Hormone Responsive Element
HRT	Hormonersatztherapie
HVL	Hypophysenvorderlappen
IFCC	International Federation of Clinical Chemistry
IGF	Insulin-like Growth Faktor
i.m.	intramuskulär
K	Kalium
kat	Katal
kg	Kilogramm
L	Liter
LH	Luteinisierendes Hormon
LNG	Levonorgestrel
Lnn	Lymphonodii
LUCC	große peroxidasenegative Zellen
LYMC	Lymphozyten
m	Meter
MCH	mittlere Hämoglobinkonzentration
MCHC	mittlere Zellhämoglobinkonzentration
MCV	mittleres Zellvolumen
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
mL	Milliliter
mmol	Millimol
MONC	Monozyten
MR	Mineralocorticoid Rezeptor
mRNA	messenger Ribonucleinsäure
MoWe	molecular weight
MW	Mittelwert
Na	Natrium
NAC	N-Acetyl-L-cystein
NEUC	neutrophile Granulozyten
ng	Nanogramm
Nr.	Nummer
Ov.	Ovulation
OCs	orale Kontrazeptiva
P4	Progesteron
PCV	Hämatokrit
PG	Prostaglandin
pg	Picogramm
PGF-2 α	Prostaglandin F-2 α
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PHOS	anorganischer Phosphor
PLT	Thrombozyten
p.o.	per os

Abkürzungen (Fortsetzung):

PR	Progesteron-Rezeptor
PRE	Proestrus
R	Akkumulation
R/B	Rizinusöl/Benzylbenzoat
RBC	Erythrozyten
RETC	Retikulozyten absolut
RETI	Retikulozyten in Prozent
RNA	Ribonucleinsäure
S	Stiftchenzellen
s.c.	subcutan
SHBG	Sexualhormon-bindendes Globulin
SI	Système International d'Unités
STAB	Standardabweichung
T1-12	Tier 1 - Tier 12
TA	Total- α -Globulin
TB	Total- β -Globulin
TG	Total- γ -Globulin
t_{max}	Zeitpunkt der maximalen Konzentration
TP	Gesamteiweiss
TPT	Thromboplastinzeit
TT	Thrombinzeit
U	Unit
UD	Uterindrüsen
uv	ultraviolett
VE	voll entsalzt
VT	Versuchstag
WBC	Leukozyten
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem
z.T.	zum Teil
%	Prozent
μ L	Mikroliter
μ mol	mikromolar
μ katal	mikrokatal

1 Einleitung

Das weibliche Endokrinium ist ein komplexes Kommunikations- und Steuerungssystem, das durch ein zeitlich sehr exaktes Zusammenspiel der Sexualhormone und des zentralen Nervensystems (ZNS) den Zyklus reguliert. Über den Hypothalamus wird die Ausschüttung des Gonadotropen Releasing Hormons (GnRH) sowie Synthese und Sekretion von Luteinisierendem Hormon (LH) und Follikelstimulierendem Hormon (FSH) im Hypophysenvorderlappen (HVL) gesteuert. Die Gonadotropine LH und FSH sind Glykoproteine, die über das Blut zu ihren Zielorganen, den Ovarien, gelangen. Dort steuern sie die Synthese und Sekretion von Sexualsteroiden, insbesondere das Estrogen 17- β -Estradiol (E2) und das Gestagen Progesteron (P4). E2 und P4 gelangen über das Blut zu ihren Zielorganen Uterus, Cervix, Vagina und Mamma. An den Zielorganen wirken E2 und P4 in bestimmten Konzentrationsverhältnissen synergistisch. Durch endokrine Feedback-Mechanismen (siehe 2.2 Sexualzyklus) kann die Sekretion von LH und FSH durch E2 und P4 gehemmt und somit der Zyklus reguliert werden [Gärtner, R. *et al.* (2001)].

Synthetische Gestagene werden beim Menschen überwiegend zur Kontrazeption und Hormon-Ersatz-Therapie (Hormon-Replacement-Therapy, HRT) sowie für die Behandlung gynäkologischer Indikationen eingesetzt. Die Mehrheit oraler Kontrazeptiva (OCs) sind Kombinationspräparate aus Estrogenen und Gestagenen. Für besondere Indikationen stehen auch Monopräparate zur Verfügung. In der Hormon-Ersatz-Therapie werden Gestagene, in der Regel in Kombination mit Estrogenen, zur Behandlung klimakterischer Beschwerden bei der Frau eingesetzt. Auch für die Behandlung gynäkologischer Indikationen, wie z. B. der Endometriose oder dem polyzystischen Ovarialsyndrom, erfolgt die Therapie mit synthetischen Gestagenen.

Im Rahmen der Arzneimittelzulassung von neuen synthetischen Sexualhormonen müssen präklinische Angaben zur Qualität, Wirksamkeit und Sicherheit von neuen Substanzen gemacht werden. Die europäische Zulassungsbehörde für Arzneimittel EMEA (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products) fordert zur Sicherheitsbewertung neuer Substanzen toxikologische Studien an zwei Säugetierarten, bei denen jeweils eine Nager- und eine Nicht-Nagerspezies eingesetzt werden soll (Guideline CPMP/ICH/286/95). Zum jetzigen Zeitpunkt sind Testmodelle von verschiedenen Nicht-Nagerspezies wie z. B. Hund, Affe sowie Kaninchen etabliert, in denen eine Vielzahl von Daten ermittelt wird, die zur Charakterisierung toxikologischer Wirkungen von neuen synthetischen Sexualhormonen beitragen. Primatenspezies stellen für die Beurteilung von Gestagenen ein sehr geeignetes Tiermodell dar, sind aber aus Tierschutzgründen aufgrund ihres hohen sinnesphysiologischen Entwicklungsgrades nicht im gewünschten Rahmen einsetzbar. Der Hund zeigt bei der Testung von Sexualsteroiden eine hohe Empfindlichkeit gegenüber Estrogenen, die sich in der Ausbildung von Tumoren äußert und ist daher für diese Substanzklasse sowie für Estrogen-/Gestagenkombinationspräparate nicht ohne weiteres als Modell geeignet [Owen, L. N. *et al.* (1976)].

Einleitung

Das Göttinger Minischwein (GM) wird, wie Hund, Affe und Kaninchen, ebenfalls als Nicht-Nagerspezies in toxikologischen Studien verwendet. Bislang wurde dieses Tiermodell jedoch nicht für die Charakterisierung synthetischer Gestagene eingesetzt. Daher sind noch keine Daten verfügbar, die einen Einsatz des GM für die Charakterisierung gestagen wirksamer Substanzen rechtfertigen. Für die Indikationen Diabetes und Artherosklerose sowie als Modell für dermatologische Applikationsformen wird das GM bereits erfolgreich eingesetzt, da viele Organsysteme (z. B. Haut, Verdauungstrakt, Herz-Kreislauf-System) in Aufbau und Funktion große Ähnlichkeit zum Menschen aufweisen [Mahl, J. A. *et al.* (2006)]; [Larsen, M. O. *et al.* (2002)]; [Xi, S. *et al.* (2004)].

Das GM besitzt einen ca. 21 Tage dauernden Ovarialzyklus, der mit dem Menstruationszyklus der Frau große Ähnlichkeiten aufweist. Dies gilt sowohl für die Zykluslänge, als auch für die Hormonkonzentrationen von LH, FSH, E2 und P4, die bei Mensch und Tier den Ablauf des Zyklusgeschehens in ähnlicher Weise dynamisch steuern. Um das GM als Tiermodell für die Bewertung pharmakologischer Effekte synthetischer Gestagene auf den Reproduktionstrakt zu verwenden, muss eine Validierung dieses Modells erfolgen. Dazu werden in einer Methodenentwicklung Endpunkte für die Beurteilung des Zyklusstandes definiert und an einigen Tieren überprüft. Anschließend wird mit einer repräsentativen Referenzsubstanz der Sexualzyklus durch die Gabe eines synthetischen Gestagens beeinflusst bzw. die Ovulation gehemmt, und es werden die im Vorfeld definierten Methoden auf ihre Aussagekraft überprüft. Zur Beurteilung dienen hierbei u.a. das Verhalten, morphologische Veränderungen am Genital, Hormonspiegel und histologische Organveränderungen. Als Referenzsubstanz dient das synthetische Gestagen Levonorgestrel (LNG), das bereits aufgrund langjähriger Anwendung in der Kontrazeption beim Menschen sowie durch zahlreiche tierexperimentelle Daten gute Voraussetzungen bietet, pharmakologische Wirkungen am GM mit denen anderer Spezies zu vergleichen.

Das Ziel dieser Arbeit bestand:

- 1) in der Ermittlung von Basisdaten, die für die Charakterisierung des Sexualzyklus des GM geeignet sind. In einem Vorversuch wurden definierte Untersuchungsmethoden auf ihre Praktikabilität und Aussagekraft geprüft, das physiologische Zyklusgeschehen beim GM „in life“ zu beurteilen.
- 2) in der Charakterisierung der pharmakologischen Wirkungen von synthetischen Gestagenen beim GM am Beispiel von LNG. Hierdurch sollte ein Vergleich der (endokrinen) Wirkungen mit anderen, gut charakterisierten Spezies ermöglicht werden, um so das GM als Tiermodell für synthetische Gestagene einsetzen zu können.

2 Literaturübersicht

2.1 Sexualsteroidoide und ihre Wirkungsmechanismen

Sexualsteroidoide sind Hormone, die für die Regulation des Sexualzyklus verantwortlich sind. Ihre Funktionen im Organismus sind beim Säuger sehr vielfältig. Sie steuern, als ein wichtiger Bestandteil des endokrinen Systems, Entwicklung, Wachstum, Reproduktion und Verhalten [Lucas, P. C. *et al.* (1992)]. Die Synthese erfolgt in speziellen Drüsen bzw. Geweben. Je nach Bedarf werden sie freigesetzt und gelangen mittels des kortikosteroid- oder sexualhormonbindenden Globulins über das Gefäßsystem zu ihren Zielorganen, wo sie schon in geringen Konzentrationen ihre Wirkung entfalten können.

Die Sexualhormone der Keimdrüsen und die Kortikosteroidoide der Nebennierenrinde werden als Steroidhormone bezeichnet. Sie stellen eine wichtige Untergruppe der Hormone des endokrinen Systems dar und gehen aus einem Teil der Cholesterinbiosynthese hervor. Über Pregnenolon werden in den Mitochondrien die männlichen Sexualsteroidoide, die Androgene, und die weiblichen Steroidhormone, die Estrogene und Gestagene, gebildet. Androgene entstehen überwiegend in den Hoden, Estrogene und Gestagene werden größtenteils in den Ovarien und während der Schwangerschaft in der Plazenta synthetisiert [Wähler, M. *et al.* (1993)]. Der bekannteste Vertreter der Mineralokorticoide, das Aldosteron, und das Glucokorticoide Cortisol entstehen in der Nebennierenrinde.

Die Wirkung an den Zielzellen wird durch die Bindung an spezifische Steroidhormonrezeptoren (SR) hervorgerufen. Im Unterschied zu den Peptid- und Proteohormonrezeptoren sind die Steroidhormonrezeptoren überwiegend im Zytoplasma lokalisiert. Wie in Abbildung 1 schematisch dargestellt, gelangen die lipophilen Hormone durch Diffusion in die Zelle und binden an den zytosolischen Steroidhormonrezeptor. Dieser besteht aus einer N-terminalen, variablen Aktivierungsdomäne, einer C-terminalen Hormonbindungsdomäne sowie einer intermediären DNA-Bindungsdomäne [Löffler, G. (1998)]. Im inaktiven Zustand ist der Rezeptor an Hitzeschockproteine gebunden. Die Hormonbindung führt dazu, dass die Hitzeschockproteine abdissoziieren, der Hormon-Rezeptor-Komplex eine Konformationsänderung durchläuft und in den Zellkern wandert. Dort erfolgt nach Dimerisierung und Bindung eines Co-Aktivators die Bindung des Hormon-Rezeptor-Komplexes an das „Hormone Responsive Element“ (HRE) der DNA [Green, S. *et al.* (1988)]. Dies führt zu einem veränderten Genexpressionsmuster, indem die Transkription der Targetgene induziert oder supprimiert wird. Anschließend erfolgt die Translation ins Zytoplasma, und die synthetisierten Proteine lösen die eigentliche Hormonwirkung aus [Gärtner, R. and Haen, E. (2001)].

Gestagene können selektiv an ihren spezifischen Rezeptor und nichtselektiv auch an andere Steroidrezeptoren binden und zusätzliche Wirkungen entfalten (siehe Tabelle 2). Die durch diese Bindung hervorgerufenen Effekte werden bei Agonisten als gestagene, androgene, estrogene, mineralocorticoide oder glucocorticoide Partialwirkungen, bei Antagonisten entsprechend als antigestagene, antiandrogene, antiestrogene, antimineralocorticoide oder antiglucocorticoide Partialwirkungen bezeichnet [Edgren, R. A. (1994)]; [Rupprecht, R. *et al.* (1993)].

Da es sich bei den Steroidhormonen um eine lipophile Hormonklasse handelt, wird die Wirkung, wie bereits oben beschrieben, überwiegend durch die Bindung an den Steroidhormonrezeptor im Zytoplasma und über den Einfluss auf die Transkription/Translation hervorgerufen. Es können aber auch nicht-genomische Hormonwirkungen über second messenger Systeme ausgelöst werden. Hierbei wird durch die Bindung an einen membranständigen Rezeptor die Membranpermeabilität für verschiedene Ionen (Na^+ , Cl^- , K^+) verändert und somit eine schnelle nicht-genomische Wirkung ermöglicht [Mahesh, V. B. *et al.* (1996)].

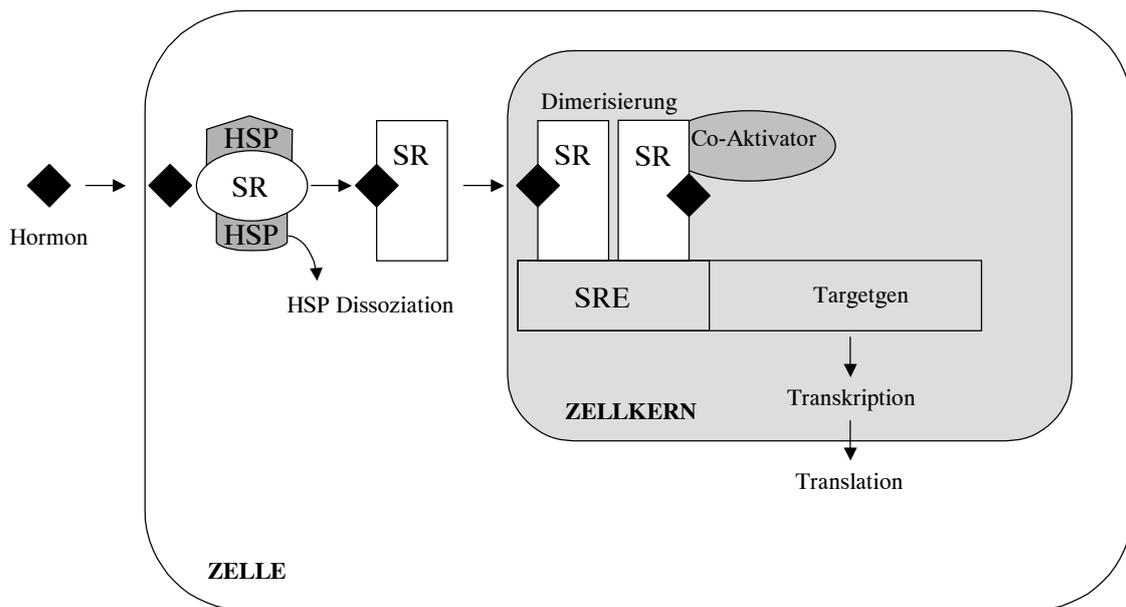


Abbildung 1: Schematische Darstellung des zellulären (genomischen) Wirkungsmechanismus von Steroidhormonen über den Steroidhormonrezeptor. HSP – Hitzeschockprotein, SR – Steroidrezeptor, SRE – Steroidhormone Responsive Element.

2.2 Sexualzyklus

Die Synthese und Sekretion der weiblichen Sexualsteroiden werden bei Säugern durch die Gonadotropine FSH und LH reguliert und kontrolliert. FSH und LH sind Glykoproteine, die in den basophilen Zellen der Adenohypophyse synthetisiert werden. Ihre Synthese, Speicherung und Sekretion wird durch das Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH) reguliert (siehe Abbildung 2), das in den Nervenzellen der Area preoptica und des Nucleus arcuatus im Hypothalamus produziert wird. Über die Endfasern der Neurone, die im Bereich der Eminentia mediana enge Beziehungen zum Kapillarnetz der zum Hypophysenvorderlappen führenden Portalgefäße aufnehmen, werden die Neurohormone freigesetzt und vom Portalblut direkt in die Adenohypophyse transportiert [Döcke, F. (1994)]; [Oettel, M. (1996)]. GnRH wird pulsatil freigesetzt, wobei sich Frequenz und Amplitude im Verlauf des Zyklus ändern. FSH und LH, ebenfalls pulsatil sezerniert, gelangen von der Adenohypophyse über das Blut zu ihren Zielzellen bzw. Zielgeweben, welche bei der Frau im Ovar lokalisiert sind.

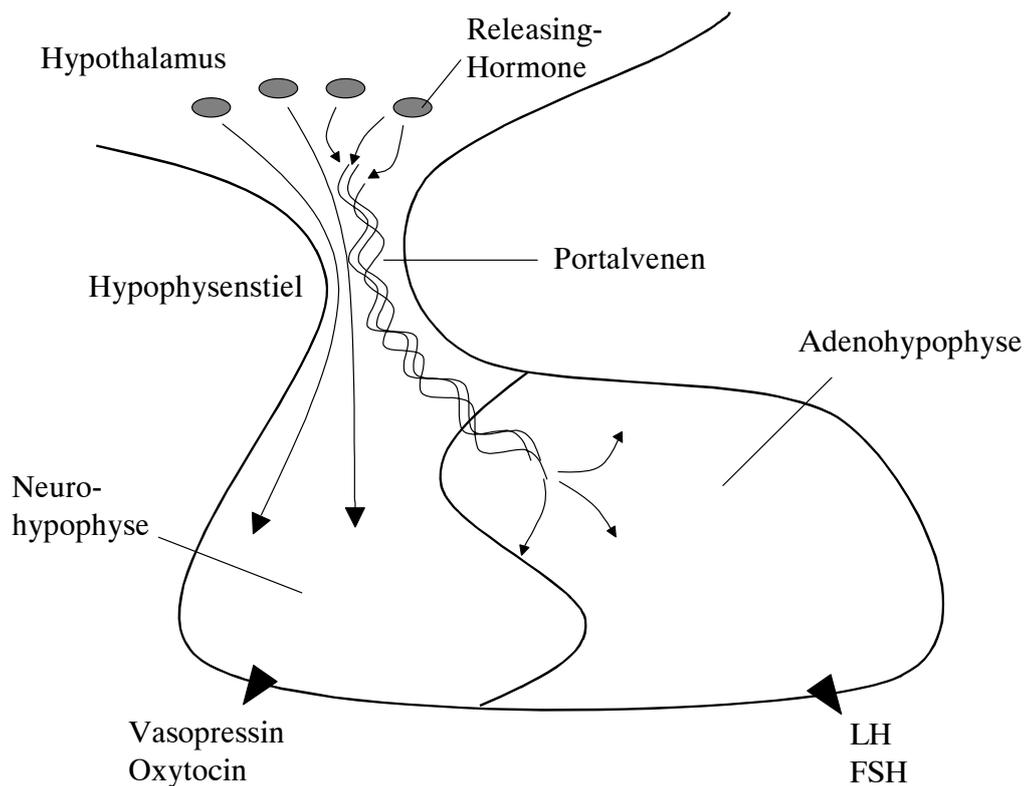


Abbildung 2: Funktionsschema von Hypothalamus und Hypophyse nach Oettel, 1996. LH - Luteinisierendes Hormon, FSH - Follikelstimulierendes Hormon.

Durch die Bindung von GnRH an den GnRH-Rezeptor in der Zellmembran einer gonadotropen Zelle wird neben der Synthese und Sekretion von FSH und LH die Zelle für GnRH sensibilisiert. Bindet das nächste GnRH Molekül an seinen Rezeptor, wird vermehrt FSH und LH sezerniert. Diese Sensibilisierung der Adenohypophyse besitzt entscheidende Bedeutung bei der plötzlichen Freisetzung von hohen LH-Konzentrationen, die zur Ovulation führen, erfordern jedoch einen ausreichenden E2-Spiegel in der Adenohypophyse.

In der frühen Follikelphase ist die E2-Konzentration niedrig und es wird nur eine geringe Menge von FSH und LH gespeichert und sezerniert. Mit ansteigender E2-Konzentration werden zunehmend FSH und LH in Form von Granula in den Zellen gespeichert, die Sekretion bleibt hiervon jedoch weitgehend unberührt.

In der weiteren Follikelphase werden die gonadotropen Zellen durch die ansteigende E2-Konzentration für GnRH sensibilisiert, gleichzeitig nimmt auch die Zahl der GnRH-Rezeptoren zu. Durch GnRH wird nun die Sekretion der gespeicherten Granula gefördert.

Durch die fortschreitende Follikelreifung wird die E2-Konzentration erhöht, gleichzeitig steigen auch Frequenz und Anzahl der GnRH-Pulse an. Im heranreifenden Follikel wird neben E2 auch Inhibin produziert. Gemeinsam hemmen E2 und Inhibin die FSH-Sekretion (negativer Feedback) aus der Adenohypophyse, während die LH-Sekretion ungehemmt bleibt (positiver Feedback), es kommt zum präovulatorischen LH-Peak [Engelhardt, W. v. *et al.* (2005)].

FSH reguliert im Zusammenspiel mit LH den ovariellen Zyklus. Durch die Sekretion von FSH werden das Wachstum und die Differenzierung von prä- und antralen Follikeln im Ovar bewirkt. Hat ein Follikel das gonadotropinreaktive Entwicklungsstadium erreicht, besitzen seine Granulosazellen FSH-Rezeptoren und Zellen der Theca interna LH-Rezeptoren. Die FSH-Konzentration steigt gegen Ende der folliculären Phase an und erreicht 2 bis 3 Tage vor der Ovulation ihren maximalen Wert. Unter dem Einfluss von LH synthetisieren die Thecazellen der ovariellen Follikel Androgene. In der Granulosazellschicht der Follikel wird unter dem Einfluss von FSH durch Stimulation der Aromatase das Testosteron der Thecazellen zu E2 metabolisiert [Reichert, L. E. (1999)]. E2 führt am Ovar zur Reifung der Follikel sowie an Uterus und Vagina zur Proliferation der Schleimhaut.

Die Zahl der FSH-Rezeptoren ist zu diesem Zeitpunkt zwar begrenzt, jedoch wird durch die estrogenbedingte Erhöhung der Granulosazellzahl des heranreifenden Follikels indirekt auch die Anzahl der FSH-Rezeptoren im Follikel erhöht. Die Vermehrung der Granulosazellen bewirkt eine Erhöhung der E2-Synthese und -Sekretion, die wiederum das Einsprossen von Blutgefäßen in die Thecazellschicht begünstigt. Auf diese Weise wird der Follikel besser mit Blut und daher auch mit FSH und E2 versorgt. Im Hypophysenvorderlappen wird durch eine negative Rückkopplung von E2 im Zusammenspiel mit Inhibin die FSH-Freisetzung reduziert. Der Follikel setzt sich von seinen Konkurrenzfollikeln ab.

In der späten Phase der Follikelreifung induziert E2 die Ausbildung von LH-Rezeptoren an den Granulosazellen und ermöglicht dem Follikel auf diese Weise, auf den ovulationsauslösenden LH-Peak zu reagieren [Ferin, M. (1999)]; [Döcke, F. *et al.* (1965)]; [Brinkley, H. J. (1981)].

LH bindet an die Rezeptoren der Granulosa- und Thecazellen, wodurch eine Reihe von Enzymkaskaden aktiviert werden, die die Ovulation auslösen. Die Granulosa- und Thecazellen des Follikels werden zu großen und kleinen Luteinzellen des Corpus luteum (CL) umgewandelt [Brinkley, H. J. (1981)]. Die Basalmembran, die sich zwischen der vaskularisierten Thecazellschicht und der gefäßlosen Granulosazellschicht befindet, wird aufgelöst. Durch die entstehenden Lücken wandern Blutzellen ein, die von Fibroblasten gefolgt werden. Der auf diese Weise gebildete Gelbkörper sezerniert jetzt P4, das die ersten Tage nach der Ovulation unabhängig von den Regulationsvorgängen des Hypophysenvorderlappens synthetisiert wird. Progesteron übt einen negativen Feedback auf die GnRH-Sekretion des Hypothalamus aus, indem die Frequenz der Pulse und die basale GnRH-Ausschüttung reduziert werden. Findet keine Befruchtung und Implantation einer Eizelle statt, bildet sich das CL unter Einfluss von Prostaglandin F_{2α} nach ca. 14 Tagen zurück und es kommt zur Luteolyse. Die Luteinzellen werden apoptotisch, sodass die Progesteronkonzentration im Blut stetig abfällt [Engelhardt, W. v. and Breves, G. (2005)].

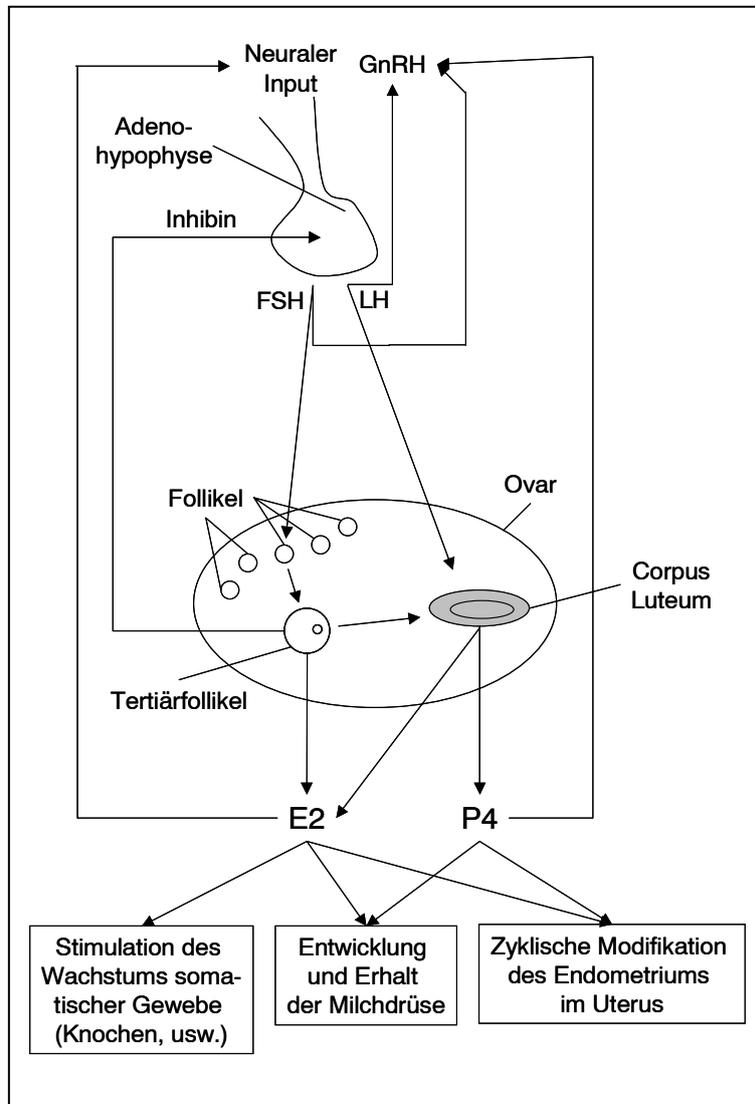


Abbildung 3: Schema der neuroendokrinen Regulation des Sexualzyklus. GnRH - Gonadotropes Releasing Hormon, FSH - Follikelstimulierendes Hormon, LH - Luteinisierendes Hormon, E2 - 17-β-Estradiol, P4 - Progesteron.

2.3 Pharmakologie der Gestagene

Progesteron ist das natürliche, überwiegend im Ovar gebildete Gestagen, das eine zentrale Rolle im ovariellen Zyklus, bei der Implantation der befruchteten Eizellen und bei dem erfolgreichen Fortgang der Schwangerschaft spielt. Als synthetische Gestagene werden Substanzen bezeichnet, die die Funktion des körpereigenen P4 nachahmen, eine Transformation des Endometriums hervorrufen und die Schwangerschaft aufrecht erhalten können.

Progesteron ist maßgeblich an der Regulation der Uterusfunktion während des Zyklus beteiligt, indem es die Proliferation und Dezidualisierung steuert. Für die Entwicklung der Dezidua und die Implantation sind hohe Progesteronspiegel notwendig, damit eine Schwangerschaft durch die Stimulation des uterinen Wachstums aufrecht erhalten werden kann. Bislang sind nicht alle Mechanismen dieses umfangreichen Prozesses geklärt. Es zeigt sich aber, dass P4 die Zellproliferation im Uterus, abhängig von Zelltyp und Zyklusstand, sowohl hemmen als auch stimulieren kann und eine wesentliche Rolle bei der Zelldifferenzierung spielt [Clarke, C. L. *et al.* (1990)]; [Savouret, J. F. *et al.* (1990)]; [Demers, L. M. *et al.* (1977)]; [Shapiro, S. S. *et al.* (1980)].

Fast alle gestagen Wirkungen werden durch ein Zusammenspiel von Gestagenen und Estrogenen ausgelöst, wobei das Ausmaß und die Wirkungsstärke vom Verhältnis bestimmt werden. Das physiologische E2:P4-Verhältnis bei der Frau beträgt ca. 1:80 [Oettel, M. (1996)].

Der Progesteronrezeptor (PR) ist bei der Frau in verschiedenen Zellen des ovariellen Follikels sowie im Gelbkörper nachweisbar [Suzuki, T. *et al.* (1994)]. Dies lässt vermuten, dass P4 auch an der Regulation der Ovulation beteiligt ist. Studien an PR-Knock-out Mäusen bestätigen, dass diese Mäuse trotz mehrerer präovulatorischer Follikel keine Ovulation zeigen [Lydon, J. P. *et al.* (1995)].

An der Cervix verhindert Progesteron das Eindringen der Spermien in den Uterus, indem es die Viskosität des Cervixsekretes erhöht. Eine weitere Wirkung liegt in der Unterdrückung der Kontraktilität des Myometriums während der Schwangerschaft. Dieser Mechanismus ist auf den Einfluss von P4 auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration und die Spiegel von Prostaglandin, Relaxin und Oxytocin zurückzuführen. Eine erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration führt zu einer vermehrten Kontraktion des Myometriums. Durch die von P4 hervorgerufene Induktion und Sekretion von Calcitonin wird der Kalziumspiegel im Uterus gesenkt und dadurch die Kontraktionsfähigkeit des Uterus herabgesetzt [Ding, Y.-Q. *et al.* (1994)]. Darüber hinaus verringert P4 die Konzentrationen von Prostaglandin F2 α und Prostaglandin E im Endometrium während der Schwangerschaft und in der lutealen Phase des Zyklus. Dadurch wird die E2-stimulierende Wirkung von Prostaglandin F2 α auf das Endometrium gehemmt [Abel, M. H. *et al.* (1980)]. Die Prostaglandinwirkungen können direkt über den Prostaglandinrezeptor und indirekt über den Oxytocinrezeptor hervorgerufen werden, dessen Expression durch Steroidhormone reguliert wird. Beispielsweise wird die Anzahl der Oxytocin-Rezeptoren im Uterus ovariectomierter Sauen durch Progesterongabe reduziert [Sheldrick, E. L. *et al.* (1993)].

Die wichtigste Rolle von P4 in der Brustdrüse ist die Ausbildung und Entwicklung lobulär-alveolärer Strukturen während der Schwangerschaft [Topper, Y. J. *et al.* (1980)]. Dies geschieht synergistisch mit E2 und Prolaktin. Vor der Geburt unterdrückt P4 die Synthese von Milchprotein [Graham, J. D. *et al.* (1997)].

Im Gehirn sind die Sexualsteroiden an der Kontrolle spezifischer Funktionen sowie dem Sexualverhalten beteiligt. Hierzu zählt z. B. das sexuelle Duldungsverhalten bei Säugetieren zum Zeitpunkt der Ovulation, das durch die Feedback-Mechanismen des neuroendokrinen Kreislaufs gesteuert wird. Die Expression des PR in der Area preoptica und im ventralen Hypothalamus korreliert mit dem E2- bzw. E2/P4-induzierten Duldungsverhalten [Parsons, B. *et al.* (1980)].

2.4 Pharmakologische Testmodelle zur Charakterisierung von Gestagenen

Für die Ermittlung pharmakologischer Wirkungen stehen verschiedene spezie-spezifische Testsysteme in etablierten Spezies zur Verfügung. Als Nager wird überwiegend die Ratte eingesetzt, während bei den Nicht-Nagern Kaninchen, Hund und Affe Verwendung finden. In diesen Modellen wird die Wirksamkeit von Substanzen in den entsprechenden Zielgeweben und Zielzellen nachgewiesen, die für eine weitere Entwicklung und geplante Anwendung am Menschen erforderlich ist. Die gebräuchlichsten Modelle für den Nachweis einer gestagenen Wirkung sind im Folgenden aufgeführt.

Die Wirksamkeit von Gestagenen auf die Gravidität wird in einer Testreihe mit ovariectomierten Ratten untersucht. Dabei werden trächtige Ratten am 8. Tag der Tragzeit ovariectomiert und über 10 Tage mit einem Gestagen und Estrogen behandelt. Am Tag 18 der Tragzeit wird die Anzahl der lebensfähigen Feten ermittelt. Dieser Test ist für die Bestimmung der Gestagenaktivität anerkannt und zeigt, ob und in welchem Maß eine natürliche Progesteronwirkung substituiert werden kann [Sitruk-Ware, R. (2004)]; [Corbin, A. *et al.* (1998)].

Ein weiterer Test an der Ratte ist der Ovulationshemmtest, der die Wirkung von Gestagenen auf den Sexualzyklus untersucht. Um eine Ovulationshemmung hervorzurufen, werden die Tiere über einen oder mehrere Zyklen mit einem Gestagen behandelt. In Abhängigkeit von der Wirkungsstärke und Dosis wird die Sekretion von LH im Plasma vermindert, die Unterbrechung der Progesteronssynthese und ein reduziertes Follikelwachstum durch die Gonadotropinhemmung in der Hypophyse hervorgerufen [Beattie, C. W. *et al.* (1975)].

Die Wirksamkeit von Gestagenen auf das Endometrium lässt sich gut am Kaninchen untersuchen [Hillesheim, H. G. *et al.* (1989)]. In diesem Gestagentest, der als Clauberg-Test bekannt ist, werden prämatüre Kaninchen über 5 Tage mit einem Gestagen behandelt, nachdem sie zuvor 6 Tage mit Estrogen geprimt wurden. Der McPhail-Index bezeichnet den Grad der Drüsenveränderungen im Endometrium und gibt einen Wert für den Grad der Transformation auf einer Skala von 0-4 (keine bis maximale Transformation). Ein Wert von mindestens 1,5 wird als Hinweis für gestagene Wirkung angesehen [Corbin, A. and Gast, M. (1998)].

Ein weiteres Tiermodell für die Erforschung und den Vergleich von Gestagen-, Antigestagen- und Estrogenwirkungen ist der Cynomolgus Affe. Durch die nahe Verwandtschaft der subhumanen Primaten zum Menschen bestehen große Ähnlichkeiten bei der Regulation des Sexualzyklus und im Aufbau des Endometriums. Auf diese Weise können die Mechanismen und die Wirksamkeit verschiedener Sexualhormone im Hinblick auf die Zykluskontrolle und Ovulationshemmung am Affen beurteilt und für einen Vergleich mit der Frau herangezogen werden. Besonders geeignet sind hierfür Parameter wie z. B. die Serum-/Plasmakonzentrationen der Sexualhormone, Veränderungen in der Hypophyse, Ausbleiben der Menses, Wachstum der Follikel, Ausbildung von Gelbkörpern und die histologische Untersuchung des Uterus, insbesondere des Endometriums [Günzel, P. *et al.* (1989)]; [Ishwad, P. C. *et al.* (1993)]; [Puri, C. P. *et al.* (1987)]; [Heikinheimo, O. *et al.* (1996)]; [van Uem, J. F. H. M. *et al.* (1989)].

2.5 Synthetische Gestagene und ihre Anwendungsgebiete

Estrogen-Gestagen-Präparate werden in Kombinations- oder Einphasenpräparate, abgestufte Kombinationspräparate und Sequential- oder Zweiphasenpräparate eingeteilt. Bei Kombinations- oder Einphasenpräparaten ist die Estrogen-Gestagen-Dosierung von Zyklustag 1 bis 21 (22) konstant, anschließend werden für den Rest des Zyklus Pillen ohne hormonell wirksame Substanzen (Plazebos) eingenommen. Einphasenpräparate sind Vertreter der klassischen Pille. Bei abgestuften Kombinationspräparaten werden Zwei- und Dreistufenpräparate unterschieden. Zweistufenpräparate enthalten in der ersten Phase des Zyklus eine geringere Gestagendosis, in der zweiten Phase eine höhere, die mit einer konstanten Estrogendosis kombiniert ist. Bei Dreistufenpräparaten wird die Gestagenmenge, teilweise auch die Estrogenmenge, von der ersten bis zur dritten Phase stufenweise verändert. Sequential- oder Zweiphasenpräparate enthalten in den ersten 6 bis 7 Tagen nur Estrogen und in den folgenden 15 Tagen eine Estrogen-Gestagenkombination ähnlich Einphasenpräparaten [Taubert, H. D. *et al.* (1981)].

Die Minipille ist ein reines, niedrig dosiertes Gestagenpräparat. Sie wird über die Gesamtlänge des Zyklus eingenommen und enthält 30 µg eines Gestagens. Die geringe Gestagendosis reicht für eine zuverlässige Ovulationshemmung nicht aus. Die kontrazeptive Wirkung wird u. a. auch durch die Veränderung des Cervixsekrets erreicht, die das Eindringen befruchtungsfähiger Spermien in den Uterus verhindert. Die Einhaltung eines strengen 24-Stunden-Rhythmus bei der Einnahme ist deshalb im Gegensatz zu den Kombinationspräparaten sehr wichtig, eine Verschiebung von 2 bis 4 Stunden kann bereits den Verlust der Wirksamkeit zur Folge haben [Lachnit, U. (1971)].

Die Menopause der Frau wird als permanentes Ausbleiben der Menstruation als Folge eines Verlustes der Hormonbildung durch die Ovarien definiert (Deutsche Menopause Gesellschaft). Durch die verminderte Hormonproduktion, insbesondere durch Estrogenmangel, treten vermehrt anovulatorische Zyklen und eine Reihe von Beschwerden auf. Hierzu gehören neben Hitzewallungen, Schlafstörungen, Schweißausbrüche sowie urogenitalen Veränderungen, wie z. B. Atrophie der Vaginal- und Uterusschleimhaut, Auswirkungen auf das Herz-Kreislauf- und das Verdauungssystem. Sehr bedeutende und weitreichende Folgen des Estrogenmangels zeigen sich häufig in postmenopausal auftretender Osteoporose [O'Connell, D. *et al.* (1998)]. Mit zunehmender Dauer der Postmenopause prägt sich diese Symptomatik weiter aus.

Die Behandlung klimakterischer Symptome wird mit der exogenen Gabe von Hormonen (Hormon-Ersatz-Therapie) behandelt. Je nach Indikation werden Estrogen- oder Estrogen-Gestagen-Präparate eingesetzt. Bei vorhandenem Uterus ist das Risiko einer Endometriums-Hyperplasie durch eine ausschließliche Verabreichung von Estrogen erhöht, weshalb hierfür Kombinationspräparate eingesetzt werden, die eine regelmäßige Menstruation (Entzugsblutung) auslösen. Bei hysterektomierten Frauen ist die Gabe von Kombinationspräparaten folglich nicht angezeigt.

Neben den oben beschriebenen Anwendungsgebieten gibt es weitere gynäkologische Erkrankungen, bei denen Estrogen-Gestagen Kombinationspräparate oder Gestagenmonopräparate zur Behandlung verabreicht werden. Hierzu zählt u. a. die Endometriose.

Abhängig von ihrer chemischen Struktur lassen sich die synthetischen Gestagene in 19-Nortestosteronderivate, 17 α -OH-Progesteronderivate, 19-Norprogesteronderivate und 17 α -Spirolacton-Derivate einteilen [Rowlands, S. (2003)]. Bei den 19-Nortestosteronderivaten werden zwei Gruppen, die Estrane und Gonane unterschieden. Zu den Estranen gehören Norethisteron und Dienogest, den Gonanen werden Levonorgestrel, Desogestrel, Gestoden und Norgestimat zugerechnet (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Biochemische Klassifizierung der Gestagene [Rowlands, S. (2003)].

Derivate des 19-Nortestosteron		Derivate des 17 α -OH-Progesteron	Derivate des 19-Norprogesteron	Derivate des 17 α -Spirolacton
<i>Estrane</i>	<i>Gonane</i>	<i>Pregnane</i>		
Norethisteron Dienogest	Levonorgestrel Desogestrel Gestoden Norgestimat	Medroxyprogesteron Cyproteron	Nomegestrol Nestoron Trimegeston	Drospirenon

Dienogest gehört aufgrund seiner Struktur zur 19-Norethisteron-Familie der Testosteronderivate und besitzt antiandrogene Partialwirkungen. Diese betragen ca. 40% der antiandrogenen Wirkung des Cyproteronacetat, dem stärksten bekannten Gestagen mit antiandrogenen Eigenschaften [Teichmann, A. (2003)]. In Kombination mit Ethinylestradiol wird es zur Kontrazeption und in Verbindung mit E2 zur HRT eingesetzt. Durch seine antiandrogene Wirkung kann es auch zur Linderung von Akne sowie zur Herabsetzung der Talgdrüsenproduktion verwendet werden. Bei der Behandlung postmenopausaler Symptome zeigt es vergleichbare Wirkung mit der Gabe von Norethisteronacetat und E2, wobei über eine Behandlungsdauer von 12 Monaten die Zahl der Zwischenblutungen nach Applikation von Dienogest signifikant geringer war [Gräser, T. *et al.* (2000)].

Gestoden gehört, wie Levonorgestrel, zur Gruppe der Gonane der Testosteronderivate, die starke gestagene Wirkungen besitzen. In Kombination mit E2 können sie in geringen Dosierungen zur Kontrazeption eingesetzt werden und eine unnötig hohe Steriodbelastung vermeiden. Zusätzlich weisen alle in Tabelle 1 genannten Gonane androgene Partialwirkungen auf.

Cyproteronacetat ist ein Pregnan und gehört zu den 17-Progesteron-Derivaten. Es zeigt sehr stark ausgeprägte antiandrogene Partialwirkungen und wird daher neben der Kontrazeption und der HRT bei androgenabhängigen Krankheiten der Frau wie Virilisierung, vermehrte Talgdrüsenproduktion sowie Akne eingesetzt.

Die 19-Norprogesteronderivate werden auch als reine Gestagene bezeichnet, da diese wesentlich selektiver an den PR binden. Die Affinität vom Trimegeston zum PR ist größer als die von Medroxyprogesteron, Levonorgestrel oder Norethisteron. Die androgenen, glukokortikoiden und mineralokortikoiden Partialwirkungen sind aufgrund der Selektivität deutlich geringer ausgeprägt. „*In vivo*“ zeigt es eine starke Progesteron-Aktivität. Am Endometrium des Kaninchens ist die Drüsenausbildung 60-fach höher als bei Medroxyprogesteron und Norethisteron [Winneker, R. C. *et al.* (2003)].

Literaturübersicht

Drospirenon ist ein Gestagen mit antimineralokortikoider Wirkung. Die Affinität zum Mineralokortikoid-Rezeptor ist 5-fach höher als die von Aldosteron. Zusätzlich weist es 30% der antiandrogenen Wirkung von Cyproteronacetat auf [Elger, W. *et al.* (2003)]; [Krattenmacher, R. (2000)]. Eingesetzt wird Drospirenon zur Kontrazeption und zur HRT. Durch seinen antimineralokortikoiden Effekt besitzt es einen großen Vorteil gegenüber den meisten anderen Gestagenen, indem es der estrogenbedingten Wassereinlagerung im Körper entgegenwirkt und eher zur Reduzierung als zur Zunahme des Körpergewichts führt [Oelkers, W. *et al.* (1995)].

Tabelle 2: Pharmakodynamische Eigenschaften verschiedener Gestagene [Muhn, P. *et al.* (1995)].

Hormon	Progesteron-Aktivität	Glukokortikoide Aktivität	Androgene Aktivität	Antiandrogene Aktivität	Antimineralokortikoide Aktivität
Progesteron	+	-	-	+	+
Drospirenon	+	-	-	+	+
Cyproteronacetat	+	(+)	-	+	-
Medroxyprogesteronacetat	+	-	+	-	-
Norethisteron	+	-	+	-	-
Levonorgestrel	+	-	+	-	-
Desogestrel	+	-	+	-	-
Gestoden	+	-	+	-	(+)
Norgestimat	+	-	+	-	-

(+) vernachlässigbare Aktivität bei therapeutischer Dosis, + Aktivität, - keine Aktivität

2.6 Levonorgestrel

Levonorgestrel (LNG) ist ein 19-Nortestosteronderivat und gehört zur Gruppe der Gonane. Bei oraler Gabe beträgt die Bioverfügbarkeit von LNG bei der Ratte 9%, beim Kaninchen 63%, beim Hund 22% und beim Menschen 87% [Hümpel, M. (1989)]; [Düsterberg, B. *et al.* (1981)]. Es besitzt androgene Partialwirkungen und ist in einer Reihe von Präparaten für die Anwendung beim Menschen zugelassen. So wird es bei der Frau überwiegend zur Behandlung prä-, peri- und postmenopausaler Beschwerden, zur Kontrazeption und Notfallkontrazeption eingesetzt. Aufgrund seiner ausführlichen Charakterisierung bei Mensch und Tier sind von LNG zahlreiche Daten von verschiedenen Spezies und vom Menschen verfügbar. Seine chemische Bezeichnung lautet D-17alpha-ethinyl-13-ethyl-17beta-hydroxy-4-gonen-3-on. Die Struktur des Moleküls ist in Abbildung 4 dargestellt.

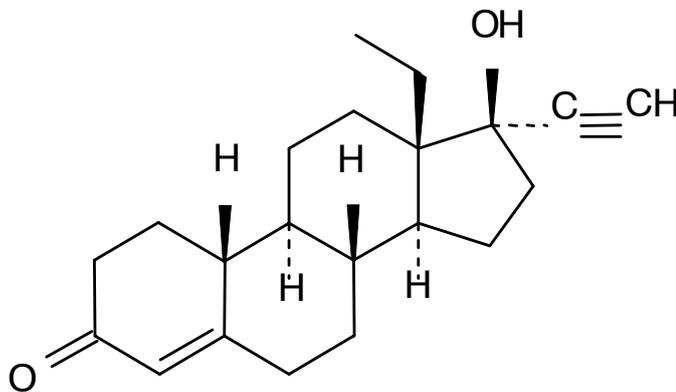


Abbildung 4: Strukturformel von Levonorgestrel

Endokrine und reproduktionspharmakologische Eigenschaften von LNG sind anhand von Studien an Kaninchen, Ratten und Mäusen belegt worden. Hierbei zeigte sich eine ausgeprägte fertilitätshemmende Wirkung, die durch Bindung von LNG an den PR hervorgerufen wird. LNG führt zur Transformation des Endometriums und hält die Gravidität in ovariectomierten, estrogensubstituierten Ratten aufrecht. Im Sexualzyklus kann es, durch Hemmung des präovulatorischen LH-Peaks, die Ovulation hemmen [Corbin, A. and Gast, M. (1998)].

Literaturübersicht

Als Basis für eine Dosisauswahl steht bereits eine Reihe tierexperimenteller Daten zur Verfügung. In einer Ovulationshemmstudie mit 4-tägiger subkutaner Applikation wurde in der Ratte mit einer Dosis von 0,1 mg/Tier/Tag bei 100% der Tiere die Ovulation gehemmt, mit 0,03 mg/Tier/Tag bei 60% der Tiere und mit 0,01 mg/Tier/Tag bei 20% der Tiere. Dies entspricht jeweils einer Dosis von ca. 0,5 mg/kg/Tag, 0,15 mg/kg/Tag und 0,05 mg/kg/Tag. Die Daten sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

In einer 26-wöchigen, systemischen Verträglichkeitsprüfung beim Hund waren ab einer Dosierung von 0,05 mg/kg/Tag aufwärts bei oraler Applikation bereits Wirkungen auf den Reproduktionstrakt zu beobachten (Ausbleiben des Zyklus, vermehrte Rötung/Schwellung der Klitoris, Fehlen von Gelbkörpern). Vergleiche hierzu Tabelle 3.

Beim Affen traten in einer 12-wöchigen, systemischen Verträglichkeitsprüfung ab 0,005 mg/kg/Tag bei oraler Verabreichung unregelmäßige Menstruationsblutungen auf, ab 0,05 mg/kg/Tag stieg die Zahl der atretischen Follikel (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: Gestagene Wirkungen bei verschiedenen Spezies [Düsterberg, B. (1981)], [Hümpel, M. *et al.* (1978)], Altrenogest – Daten [Dutta, C. *et al.* (1990)].

Spezies	mg/Tag	mg/kg/Tag	Appl.	BV [%]	Wirkung
LNG					
Ratte (200g)	0,1	0,5	s.c.	100	Ov. hemmung bei 100 % der Tiere
	0,03	0,15			Ov. hemmung bei 60 % der Tiere
	0,01	0,05			Ov. hemmung bei 30 % der Tiere
Hund	-	0,05	p.o.	22	Ausbleiben des Zyklus, Fehlen von Gelbkörpern
Affe	-	0,05	p.o.	9	Erhöhte Anzahl atretischer Follikel
	-	0,005			Unregelmäßige Menstruationsblutungen
Mensch	0,05	0,001	p.o.	87	Ov. hemmung
Altrenogest					
Mischschwein	15	-	p.o.	-	Auftreten der Brunstanzeichen 5-7 Tage nach Behandlungsende
	-	0,044		-	Auftreten der Brunstanzeichen ca. 1 Woche nach Behandlungsende

LNG – Levonorgestrel, BV – Bioverfügbarkeit, Ov. – Ovulation, p.o. – per os, s.c. – subcutan

In der Veterinärmedizin wird Allyl Trenbolon (Altrenogest®), ein Derivat des 19-Nortestosterons, zur Estrus- bzw. Brunstsynchronisation, insbesondere beim Schwein eingesetzt. Dabei steht die Ovulationsinduktion präpuberaler und Synchronisation puberaler Sauen im Vordergrund [Baker, R. D. *et al.* (1973)]; [Baker, R. D. *et al.* (1968)]; [Downey, B. R. *et al.* (1994)]; [Knox, R. V. *et al.* (2000)]; [Knox, R. V. *et al.* (1999)]. Bei täglicher Gabe von 15 mg/Tier/Tag über 14 Tage wurde durch die Hemmung der Gonadotropinsekretion der Zyklus unterbrochen. Erst 5-7 Tage nach Ende der Behandlung setzte bei allen Tieren der Estrus ein [Diehl, J. R. *et al.* (1986)]. So können die Besamungs- und Aufzuchtzeiträume in der Schweineproduktion zentral gesteuert werden.

2.7 Das Göttinger Minischwein

Beim Göttinger Minischwein (GM) handelt es sich um eine Kreuzung zwischen Minnesota Minischwein, Vietnamesischem Minischwein und der deutschen Landrasse. Diese Kreuzung wurde von 1960 bis 1964 im Institut für Tierzucht und Haustiergenetik der Universität Göttingen entwickelt [Glodek, P. (1986)].

Mit dieser Rasse sollte ein Tiermodell geschaffen werden, das bei ausgewachsener Größe klein und leicht handhabbar ist, sowie aufgrund des Körpergewichts geringere Substanzmengen benötigt als das Hausschwein. Große Ähnlichkeiten mit dem Menschen bestehen im Bereich Anatomie und Physiologie [Bustad, L. K. (1966)]. Für chirurgische Grundtechniken, sowie für pharmakologische, pharmakokinetische und verschiedene toxikologische Untersuchungen wird das Minischwein bereits verwendet, da sich im Gegensatz zu anderen Spezies vielfältige anästhetische Möglichkeiten, häufige Probennahmen und hohe Qualitätsstandards bei einfachen Haltungsbedingungen realisieren lassen [Witkamp, R. F. *et al.* (1998)]; [Lehmann, H. (1998)]; [Mortensen, J. T. *et al.* (1998)]. In reproduktionstoxikologischen Untersuchungen ist das Minischwein, trotz seiner relativ langen Tragzeit von ca. 114 Tagen, der Wurfgröße von 5-6 Tieren bei primiparen und 6-8 bei multiparen Sauen, der frühen Geschlechtsreife und der einfachen Züchtung, eine mögliche Alternative zu Affen [Damm Jorgensen, K. (1998)]. Mit einem Geburtsgewicht von 350-400 g sind die Eber nach 3-4 Monaten, die Sauen nach 4-5 Monaten geschlechtsreif und wiegen in Abhängigkeit von der Fütterung zu diesem Zeitpunkt zwischen 6-8 bzw. 7-9 Kilogramm [Glodek, P. (1986)]; [Bollen, P. *et al.* (1997)].

GMe besitzen einen polyestrischen, asaisonalen Ovarialzyklus, dessen Einsetzen u.a. von Faktoren wie Zuchtlinie, Rasse, aber auch Haltungsbedingungen und Fütterung abhängig ist [Wiggins, E. L. *et al.* (1950)]; [Christenson, R. K. *et al.* (1979)]. Die Zykluslänge beträgt 21 ± 3 Tage und wird in Estrus (Tag 1 bis 3), Postestrus (Tag 4 bis 6), Di-/Interestrus (Tag 7 bis 19) und Proestrus (Tag 19 bis 21) eingeteilt [Holtz, W. *et al.* (1973)].

Zum Zyklus der Frau bestehen Parallelen im Verlauf der Hormonkonzentrationen, allerdings ist die Benennung der Zyklustage unterschiedlich. Definitionsgemäß wird der erste Tag der Menstruationsblutung bei der Frau als Tag 1 des Zyklus bezeichnet, die Zykluslänge beträgt durchschnittlich 28 Tage. Die Ovulation ereignet sich an Tag 14/15, hierbei ist meistens nur ein dominanter Follikel an einem der beiden Ovarien betroffen. Beim Schwein ist Zyklustag 1 der Tag, an dem die Sau zum ersten Mal Paarungsbereitschaft signalisiert und den Duldungsreflex zeigt [Signoret, J. P. (1970)]; [Soede, N. M. *et al.* (1997a)]; [Soede, N. M. *et al.* (1997b)]. Die Ovulation folgt ein bis zwei Tage später, die Ovulationsrate liegt durchschnittlich bei 14-18 Eizellen pro Brunst [Damm Jorgensen, K. (1998)]; [Holtz, W. *et al.* (1999)]; [Holtz, W. (1996)]. Während des Proestrus/Estrus ist bei weiblichen Schweinen durch einen höheren E₂-Spiegel eine Rötung und Schwellung der Vulva zu beobachten [Eliasson, L. (1989)]; [Soede, N. M. and Kemp, B. (1997b)]; [Kilgour, R. J. *et al.* (1994)]; [Barbe, C. *et al.* (2004)]. Während des Estrus kommt es zu Vaginalschleimbildung [Schilling, E. *et al.* (1964)].

Literaturübersicht

Unter dem Einfluss der ständig wechselnden Hormonkonzentrationen wurden auch bei Schweinen zyklische Veränderungen der Vaginalzytologie beobachtet. [Branscheid, W. *et al.* (1988)]; [Holtz, W. and Smidt, D. (1973)]; [Rodgers, J. B. *et al.* (1993)].

In Abbildung 5 ist eine Gegenüberstellung der Zyklen von Schwein und Mensch anhand einiger Parameter zu sehen. In beiden Fällen kommen die Gonadotropine FSH und LH als Gonadenstimulierende Proteohormone vor, die über cAMP die Biosynthese der Sexualhormone induzieren.

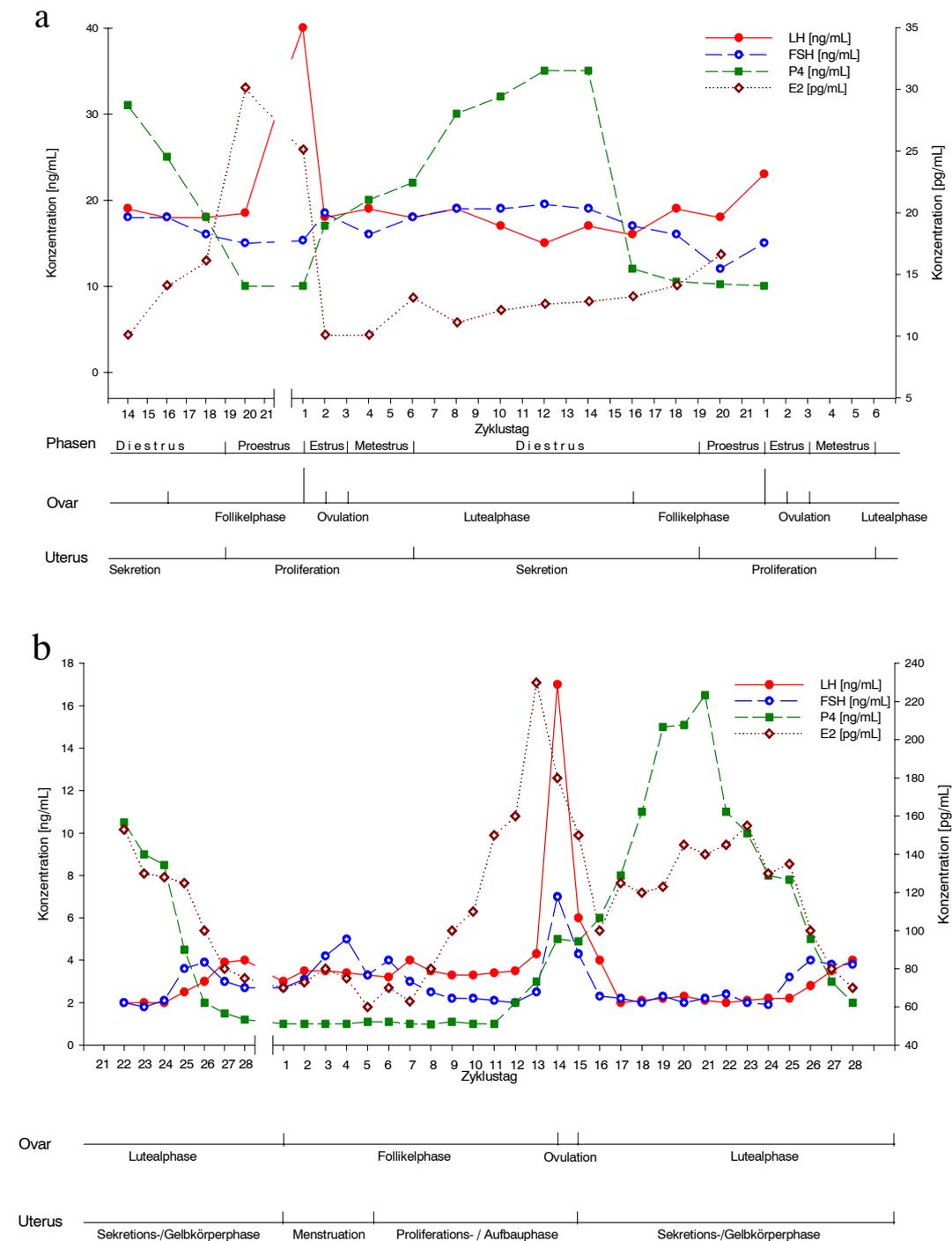


Abbildung 5: a: Hormonkonzentrationen während des Ovarialzyklus beim Schwein modifiziert nach van de Wiel et al., 1981 mit Übersicht der Zyklusphasen und Ereignisse an Ovar und Uterus.

b: Hormonkonzentrationen während des Menstruationszyklus bei der Frau sowie Ereignisse an Ovar und Uterus [Wilson, C. A. *et al.* (1992)].

LH – Luteinisierendes Hormon, FSH – Follikelstimulierendes Hormon, P4 - Progesteron, E2 – 17- β -Estradiol.

3 Material und Methoden

3.1 Tiere, Versorgung und Haltungsbedingungen

Für die Untersuchungen wurden insgesamt 18 weibliche, geschlechtsreife, nullipare GMe (Ellegaard, Dänemark) verwendet. Zu Beginn der Untersuchungen waren alle Tiere geschlechtsreif, ihr Alter betrug 7-9 Monate und das Körpergewicht lag zwischen 11,7 und 18,3 kg. Nach der tierärztlichen Eingangsuntersuchung durchliefen alle Tiere eine Akklimatisationsphase von mindestens 14 Tagen. Die Unterbringung der Minischweine erfolgte konventionell in Einzelboxen ohne Einstreu. Die Boxengrundfläche betrug ca. 2 m² und wurde täglich mit warmem Wasser gereinigt. Als Futtermittel wurde Ssniff Mpig-Ered[®], ein speziell energiereduziertes Alleinfuttermittel für Minischweine, verwendet, das in pelletierter Form alters- und geschlechtsabhängig täglich in einer Menge von ca. 300 bis 450 g pro Tier verabreicht wurde. Zusätzlich bekamen alle Tiere während der Fütterung einen Apfel. Trinkwasser wurde per Nippeltränke ad libitum angeboten.

Die Klimaanlage der Tierhaltungsräume wurde mit Außenluft betrieben. Der Luftwechsel betrug 8-12 fach pro Stunde. Die Stalltemperaturen variierten während des Vor- und Hauptversuchs zwischen 20-24°C, die Luftfeuchtigkeit bewegte sich um 60 ± 20%. Tagsüber waren die Ställe von 6-18 Uhr beleuchtet. Jedes Tier war mit einer nummerierten Ohrmarke gekennzeichnet.

Um bei den Sauen den natürlichen Duldungsreflex (DR) auszulösen, wurden 3 männliche GMe als Sucheber verwendet, deren Aufgabe darin bestand, die brünstigen Sauen anzuzeigen. Die Eber wurden alternierend eingesetzt, die Haltungsbedingungen entsprachen denen der weiblichen Tiere.

3.2 Methoden

Zur Zyklusbestimmung am GM wurden DR, Rötung/Schwellung der Vulva, Bildung von Vaginalschleim, die Vaginalzytologie und die Konzentrationen der Hypophysenhormone LH und FSH sowie die Konzentration der ovariellen Hormone E2 und P4 untersucht. Die Erfassung von Veränderungen an Uterus und Ovarien erfolgte per Ultraschalluntersuchung.

3.2.1 Duldungsreflex

Die Auslösung des DRs erfolgte auf natürliche (durch den Eber) und artifizielle Weise (durch den Menschen). Der erste Tag, an dem ein Tier einen DR zeigte, wurde daher als 1. Zyklustag festgelegt [Bressers, H. P. M. *et al.* (1991)]. Als Brunst wurden 2 oder mehr aufeinander folgende DRe definiert, die für die Festlegung des Versuchsbeginns herangezogen wurden.

Auf natürliche Weise wurde der DR durch den Aufsprung eines Suchebers ausgelöst. War der DR vorhanden, blieb die Sau unbeweglich stehen, krümmte den Rücken und spitzte die Ohren. Auch olfaktorische und taktile Reize des Ebers spielen hierbei eine Rolle [Signoret, J. P. (1970)].

Zur Prüfung des DR wurde ein Eber in die Box einer Sau getrieben und dort solange eingesperrt, bis nach zwei aufeinander folgenden Aufsprüngen kein DR erkannt wurde.

Artifizuell wurde der Duldungsreflex ausgelöst, indem mit der flachen Hand auf die Lendenwirbelsäule der Sau gedrückt wurde. Das Verhalten wurde entsprechend des natürlichen DR gewertet.

Der Versuchsbeginn und die Zählung der Versuchstage richtete sich nach dem ersten Auftreten der Brunst nach der Akklimation bzw. nach dem Vorzyklus. Die Zykluslänge wurde anhand des Abstands des ersten Tages zweier aufeinanderfolgender Zyklen errechnet.

3.2.2 Rötung/Schwellung der Vulva

Der Grad der Rötung/Schwellung wurde bei jedem Tier wie folgt beurteilt: 0 = keine Rötung/Schwellung, 1 = mittlerer Grad der Rötung/Schwellung und 2 = deutlicher Grad der Rötung/Schwellung.

3.2.3 Bildung von Vaginalschleim

Zur Gewinnung des Vaginalschleims wurde am fixierten Tier ein Abstrich mit einem Metallspatel genommen. Hierzu wurde an den Seitenwänden und am Grund der Vagina entlang gefahren und der am Spatel haftende Schleim auf Quantität (0 = kein Schleim, 1 = geringe Menge, 2 = mittlere Menge, 3 = große Menge), Qualität (1 = klar, 2 = trüb) und Konsistenz (1 = flüssig, 2 = fadenziehend) beurteilt.

3.2.4 Vaginalzytologie

Zur Gewinnung der Zellen aus der Vagina wurden Abstriche mit einer Einmal-Impfschlinge (1µL) analog zur Gewinnung des Vaginalschleims vorgenommen. Die mit der Impfschlinge entnommenen Zellen wurden auf einen Objektträger ausgestrichen, getrocknet und panoptisch nach Pappenheim gefärbt [Pappenheim, A. (1912)].

Für die Färbereaktion wurden folgende Lösungen und Reagenzien verwendet: 1. May-Grünwald Stammlösung (Firma Merck, Darmstadt, Deutschland), 2. Giemsa-Stammlösung (Firma Merck, Darmstadt, Deutschland), 3. May-Grünwald Gebrauchslösung (100 mL May-Grünwald-Stammlösung und 100 mL Aqua demineralisata), 4. Giemsa-Gebrauchslösung (5 mL Giemsa-Stammlösung und 175 mL Aqua demineralisata). Die Beurteilung der Erythrozyten, Leukozyten sowie kernhaltigen und kernlosen (scholligen) Epithelzellen erfolgte mit Hilfe eines Lichtmikroskops Typ Axioskop 40 (Firma Zeiss, Jena, Deutschland) bei 100-facher Vergrößerung (siehe Tabelle 4). Das Auftreten der einzelnen Zelltypen wurde pro Gesichtsfeld wie folgt klassifiziert: 1 = wenig (1-5 Zellen pro Gesichtsfeld), 2 = mittel (5-20 Zellen pro Gesichtsfeld) und 3 = viel (mehr als 20 Zellen pro Gesichtsfeld).

Tabelle 4: Ergebnisse der panoptischen Färbung nach Pappenheim [Romeis, B. (1989a)].

Zellbestandteil	Färbeergebnis
Kerne	Rot-violett
Eosinophile Granulozyten	Rot
Basophile Granulozyten	Violett-blau
Neutrophile Granulozyten	Hellblau-violett
Azurgranula	Purpurrot
Zytoplasma	Blau
Erythrozyten	Rosarot
Thrombozyten	Blau mit violettem Innenkörper

3.2.5 Ultraschalluntersuchung von Ovar und Uterus

Die Ultraschalluntersuchung erfolgte mit einem Gerät der Firma ATU (Philips Medizin Systeme GmbH, Deutschland), Modell HDI 5000, mit einem 12 – 5 MHz und 7,5 – 5 MHz Schallkopf. Als Kontaktgel wurde SONOGEL[®] (Firma SONOGEL Vertrieb GmbH, Bad Camberg, Deutschland) verwendet. Die Untersuchungen wurden im S-VHS VideofORMAT aufgezeichnet. Die Tiere befanden sich während der Ultraschalluntersuchung in einer Futterbox mit folgenden Maßen: Höhe 47 cm, Länge 90 cm und Breite 50 cm. Auf diese Weise wurde ihre Bewegungsfähigkeit eingeschränkt und das Drehen um die eigene Achse erschwert. Nach einer Trainingsphase konnten die Untersuchungen, wie unten beschrieben, durchgeführt werden. Die Untersuchungen erfolgten jeweils am Montag und am Donnerstag transabdominal durch die Bauchdecke am stehenden Tier. Hierzu wurde der Schallkopf in der rechten bzw. linken Kniefalte dorsal zum letzten Zitzenpaar angesetzt.

Am rechten und linken Uterushorn wurde die Endometriumsdicke in Millimetern gemessen.

Am rechten und linken Ovar wurden Durchmesser der Follikel und Corpora lutea (CL) in Millimeter bestimmt.

3.2.6 Bestimmung der endogenen Hypophysen- und Ovarhormonkonzentrationen

Für die Bestimmung der Konzentrationen der Hypophysenhormone LH und FSH sowie der ovariellen Hormone E2 und P4 wurden 6 mL Vollblut aus der Vena jugularis externa entnommen. Als Abnahmegefäße dienten S-Monovetten mit einem Volumen von 8,2 mL (Firma Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) mit Citratzusatz.

Die Blutproben wurden nach Beendigung der Probennahme im Labor weiterverarbeitet. Nach 15-minütigem Zentrifugieren bei 3000 U/min und 20°C wurde durch Abpipettieren des Überstandes eine Plasmamenge von ca. 3 mL in Nunc-Röhrchen mit einem Volumen von 3,6 mL (Firma Nunc, Wiesbaden Deutschland) gewonnen. Anschließend wurden die Plasmaproben mit Versuchsnummer und Tiernummer, Datum und Inhalt beschriftet und bei einer Temperatur von –24°C eingefroren.

Die Blutentnahmen erfolgten jeden 3. Tag mit Einsetzen des Proestrus (Aufreten von Rötung oder Schwellung der Vulva), an den darauffolgenden 6 Tagen täglich. Die Bestimmung der Hormonkonzentrationen wurde vom Institut für Tierzucht und Haustiergenetik, Albrecht-Thaer-Weg 3, Arbeitsgruppe Fortpflanzung und Biotechnologie der Georg-August-Universität Göttingen unter der Leitung von Prof. Dr. Wolfgang Holtz und Dr. Judith Reischl mit nachfolgend beschriebenen Methoden mittels Enzymimmunoassay durchgeführt:

Follikelstimulierendes Hormon

Die FSH-Konzentration wurde in 0,2 mL Plasma mittels eines Enzymimmunoassays auf Mikrotiterplatten nach der Doppelantikörpermethode bestimmt [Mann, E. (1996)]. Als Beschichtungsantikörper diente ein Schaf-anti-Kaninchen Immunglobulin, als zweiter Antikörper ein tierartsspezifischer polyklonaler Antikörper. Die untere Nachweisgrenze lag bei 0,3 ng/mL, die Intraassayvarianz betrug 6,7%, die Interassayvarianz 15%.

Luteinisierendes Hormon

Die LH-Konzentration wurde in 0,2 mL Plasma mittels eines Enzymimmunoassays auf Mikrotiterplatten nach der Doppelantikörpermethode bestimmt [Moeller, R. (1991)]. Als Beschichtungsantikörper wurde ein Schaf-anti-Kaninchen Immunglobulin, als zweiter Antikörper ein tierartsspezifischer polyklonaler Antikörper verwendet. Die untere Nachweisgrenze lag bei 0,1 ng/mL, die obere Nachweisgrenze bei 10,0 ng/mL. Die Intraassayvarianz betrug 9,3%, die Interassayvarianz 16,4% [Mann, E. (1996)]. Werte, die größer bzw. gleich 10,0 ng/mL waren, wurden graphisch als 10,0 ng/mL abgebildet.

Progesteron

Die P4-Konzentration wurde in 0,2 mL Plasma mittels eines enzymimmunologischen Messverfahrens bestimmt [van de Wiel, D. F. *et al.* (1986)]. Die untere Nachweisgrenze lag bei 0,5 ng/mL, die Intraassayvarianz lag bei 8,8%, die Interassayvarianz bei 11%. Werte, die kleiner bzw. gleich 0,5 ng/mL waren, wurden als 0,5 ng/mL abgebildet.

17-β-Estradiol

Die Bestimmung der E2-Konzentration in 2 mL Plasma wurde mittels eines Enzymimmunoassays auf Mikrotiterplatten nach der Doppelantikörpermethode durchgeführt [Mann, E. (1996)]. Bedingt durch die geringe E2-Konzentration im Blut musste das Plasma zuvor einer Etherextraktion unterzogen werden. Als Beschichtungsantikörper diente ein Schaf-anti-Kaninchen Immunglobulin, als zweiter Antikörper ein tierartunspezifischer polyklonaler Antikörper [Wallenhorst, S. (1996)]. Die untere Nachweisgrenze lag bei 3 pg/mL, die Intraassayvarianz betrug 5,9%, die Interassayvarianz 11,5%. Werte, die kleiner bzw. gleich 3 pg/mL waren, wurden graphisch als 3 pg/mL abgebildet.

3.2.7 Levonorgestrel-Bioanalytik

Für die Bestimmung der LNG-Konzentration im Plasma wurden 2,5 mL Vollblut aus der Vena jugularis externa entnommen. Als Zusatz wurde Lithium-Heparin verwendet. Die gemessenen Parameter sind in Tabelle 5 aufgeführt. Die Probenentnahme erfolgte ab Behandlungstag 13 jeden 3. Tag 24 Stunden nach der Applikation. Zusätzlich wurde das Wirkstoffspiegelprofil des ersten und letzten Behandlungstages jeweils 0, 4, 8, 12 und 24 Stunden nach der Applikation bestimmt. Die Proben wurden bis zum Ende der Studie bei -24°C gelagert und anschließend gesammelt an das Institut Applied Analytical Industry (AAI) nach Neu Ulm geschickt. Die Messungen wurden vom AAI¹ nach Baumeister durchgeführt. Die Intra-day precision betrug CV = 2,58% (CV = overall precision), die Intra-day accuracy bias = -3,01% (bias = overall accuracy), die Inter-day precision CV = 2,44% und die Inter-day accuracy bias = 0,81%.

Die untere Nachweisgrenze von LNG betrug 125 pg/mL. Aus den Messwerten der 0-24 Stunden Profile wurden mit der Software KineticaTM, PC Version 4.1 (Inna Phase Cooperation), folgende Parameter der 0,02 mg/kg und 0,1 mg/kg LNG-Dosisgruppen berechnet: Die

Tabelle 5: Parameter der LNG-Bioanalytik

Parameter	Symbol
Maximale Konzentration	C_{max}
Zeitpunkt der maximalen Konzentration	t_{max}
Fläche unter der Kurve von 0-24 h nach der Applikation	$AUC_{(0-24h)}$
Akkumulation	R

LNG - Levonorgestrel

¹ Baumeister A. (1996), Quantitative Determination of Levonorgestrel in Human Plasma by Positive Ion Chemical Ionisation Gas Chromatography / Mass Spectrometry.

3.2.8 Gerinnungsphysiologische, hämatologische und klinisch-chemische Untersuchungen, Protein-Elektrophorese

Um mögliche Effekte von LNG auf das Blut, die Organsysteme oder den Stoffwechsel der Tiere zu beobachten, wurden jeweils vor und während der Behandlung zusätzliche Untersuchungen durchgeführt.

Die Thrombinzeit (TT), Thromboplastinzeit (TPT), aktivierte partielle Thromboplastinzeit (APTT) und Fibrinogen (FI) wurden vor und während der Behandlung mit LNG mit dem Amax 190 Plus™ von Sigma Diagnostics in 1,4 mL Citrat-Plasma gemessen. Bei Werten, die bei der Messung deutlich nach oben oder unten abwichen, wurden erneut Proben entnommen und gemessen. Die verwendeten Methoden sind in Tabelle 6 aufgeführt:

Tabelle 6: Gerinnungsparameter

Parameter (Abkürzung)	Einheit
Thrombinzeit (TT)	Sekunden
Thromboplastinzeit (TPT)	
Aktivierte partielle Thromboplastinzeit (APTT)	
Fibrinogen (FI)	mg/100 mL

mg – Milligramm, mL - Milliliter

Rotes Blutbild

Die Messung von roten Blutkörperchen (RCB), Hämoglobin (HGB), Hämatokrit (PCV), mittlerem Zellvolumen (MCV), mittlerem Zellhämoglobinkonzentration (MCH), Retikulozyten im Verhältnis zu den Gesamterthrozyten (RETI %) und Retikulozyten absolut (RETC) erfolgte vor und während der Behandlung mit LNG mit dem Advia 120 von Bayer Diagnostics in 1,2 mL K-EDTA-Blut.

Weisses Blutbild

Die Messung der weißen Blutkörperchen (WBC), Neutrophilen (NEUC), Lymphozyten (LYMC), Monozyten (MONC), eosinophilen Granulozyten (EOC), basophilen Granulozyten (BASC), peroxidasenegativen Zellen (LUCC) und Thrombozyten (PLT) erfolgte vor und während der Behandlung mit LNG mittels des Advia 1650 von Bayer Diagnostics. Die verwendeten Methoden sind in Tabelle 7 aufgeführt:

Tabelle 7: Hämatologische Parameter

Parameter (Abkürzung)	Methode	Einheit
Leukozyten (WBC)	Zytochemische Peroxidase Reaktion	10 ⁹ /L
Erythrozyten (RBC)	Durchflusszytometrie	10 ¹² /L
Hämoglobin (HGB)	Modifizierte Cyanmethämoglobin Reaktion	mmol/L
Hämatokrit (PCV)	Errechnet aus RBC und MCV	L/L
Mittleres Zellvolumen (MCV)	Durchflusszytometrie	fL
Mittlere Hämoglobinkonzentration (MCH)	Errechnet aus RBC und HGB Konzentration	fmol
Mittlere Zellhämoglobinkonzentration (MCHC)	Errechnet aus HGB + PCV	mmol/L
Thrombozyten (PLT)	Durchflusszytometrie	10 ⁹ /L
Neutrophile (NEUC), Lymphozyten (LYMC), Monozyten (MONC), Eosinophile (EOC), Basophile (BASC), große peroxidasenegative Zellen (LUCC)	Zytochemische Peroxidase Reaktion und Durchflusszytometrie	10 ⁹ /L
Retikulozyten (RETC)	Durchflusszytometrie und spezifische RNA Farbreaktion	10 ¹² /L
Blutausstrichfärbung	Pappenheim (May-Grünwald/Giemsa)	

L – Liter, mmol – Millimol, fL – Femtoliter, RNA – Desoxyribonucleinsäure

Die Messung der Aspartat-Aminotransferase (AST), Alanin-Aminotransferase (ALT), alkalischen Phosphatase (ALP), Gamma-Glutamyl-Transferase (GGT), Creatinkinase (CK), Glukose (GLU), Cholesterin (CHOL), Harnstoff-Stickstoff (BUN), Creatin (CREA), Magnesium (MG), Phosphor (PHOS), Natrium (NA), Kalium (K), Kalzium (CA), Chlorid (CL) und Totalprotein (TP) erfolgte vor und während der Behandlung mit LNG mittels des Advia 1650 von Bayer Diagnostics in 1,5 mL Vollblut. Die verwendeten Methoden sind in Tabelle 8 aufgeführt:

Tabelle 8: Klinisch-chemische Parameter

Parameter (Abkürzung)	Methode	Einheit		Transformation Faktor (F); alt x F = SI
		alt	SI	
Aspartat- Aminotransferase (AST)	IFCC (International Federation of Clinical Chemistry) mit Pyridoxalphosphat-aktivierung bei 37°C	U/L	ukat/L	0,0167
Alanin- Aminotransferase (ALT)	IFCC (International Federation of Clinical Chemistry) mit Pyridoxalphosphat-aktivierung bei 37°C	U/L	ukat/L	0,0167
Gamma-Glutamyl- Transferase (GGT)	IFCC (International Federation of Clinical Chemistry) bei 37°C	U/L	ukat/L	0,0167
Alkalische Phosphatase (ALP)	IFCC (International Federation of Clinical Chemistry) bei 37°C	U/L	ukat/L	0,0167
Cholesterin (CHOL)	CHOD-PAP-Methode, UV-Test bei 37°C	mg/100mL	mmol/L	0,0259
Glukose (GLU)	Glukose Hexokinase-Methode, UV-Test bei 37°C	mg/100mL	mmol/L	0,0555
Harnstoff - Stickstoff (BUN)	Harnstoff - Urease mit GLDH bei 37°C	mg/100mL	mmol/L	0,3569
Creatinin (CREA)	Creatinin (Jaffe) bei 37°C	mg/100mL	umol/L	88,4
Creatinkinase (CK)	IFCC (International Federation of Clinical Chemistry) bei 37°C	U/L	ukat/L	0,0167
Anorganischer Phosphor (PHOS)	UV-Methode-Molybdat-Reaktion bei 37°C	mg/100mL	mmol/L	0,3229
Magnesium (MG)	Xylidblau bei 37°C	mmol/L	mmol/L	1,0
Natrium (Na), Kalium (K) und Chlorid (Cl)	Ionenselektiv (indirekt) bei 37°C	mmol/L	mmol/L	1,0
Kalzium (Ca)	o-Kresolphthalein-Komplexon bei 37°C	mmol/L	mmol/L	1,0
Total Protein (TP)	Biuret-Methode bei 37°C	g/100mL	g/L	10,0

SI - Système International d'Unités, U - Unit, L - Liter, ukat - microkatal, mg - Milligramm, mL - Milliliter, mmol - millimol, g - Gramm, °C - Grad Celsius, GLDH - Glutamatdehydrogenase, CHOL-PAP - Cholesterol Oxidase Phenol 4-Aminoantipyrene Peroxidase

Material und Methoden

Die Messungen von Albumin, Alpha-, Beta-, Gammaglobulin sowie der Quotient aus Alpha- und Gammaglobulin wurden mit einem Hydrasys LC der Sebia GmbH mit den in Tabelle 9 genannten Methoden durchgeführt. Die Auswertung erfolgte durch einen Hyrys Hit (Sebia GmbH, Fulda, Deutschland).

Tabelle 9: Methode der Protein Elektrophorese

Parameter	Methode	Einheit		Transformation Faktor (F); alt x F = SI
		alt	SI	
Serumprotein	Agarosegel Elektrophorese, Amid-Schwarz Färbung, Auswertung über Densitometer Hyrys Hit, Firma Sebia	% oder g/100mL	% oder g/L	10,0

SI – Système International d'Unités, % - Prozent, g – Gramm, mL – Milliliter, L - Liter

3.2.9 Bestimmung des Futtermittelsverbrauchs und der Körpergewichte

Der Futtermittelsverbrauch wurde im Hauptversuch ab dem ersten Versuchstag 1x täglich mit einer Waage des Typs MT PG3001-S (Firma Mettler Toledo, Giessen, Deutschland) ermittelt. Die Körpergewichte wurden im Vor- und Hauptversuch 1x wöchentlich bestimmt. Im Hauptversuch erfolgten die Messungen an den Versuchstagen 1, 8, 15, 22, 29 und 35. Für die Wägung der Tiere wurde eine Waage Typ KC 120 (Firma Mettler Toledo, Giessen, Deutschland) verwendet.

3.2.10 Postmortale Untersuchungen

Makroskopische Befunderhebung

Vor Sektionsbeginn wurde das äußere Erscheinungsbild begutachtet (Körperöffnungen, Ernährungszustand, usw.). Unmittelbar nach dem Entbluten wurden die terminalen Körpergewichte der Tiere ermittelt. Bei der Sektion wurden die Körperhöhlen und Organe auf Inhalt, Schnittfläche, Umfangsvermehrungen und sonstige Veränderungen beurteilt. Von allen aufbereiteten Organen wurden die absoluten Gewichte in Gramm (g) und die relativen Organgewichte im Vergleich zum Gehirn in Prozent (%) ermittelt. Da das Körpergewicht der Tiere alters- und fütterungsbedingt variieren kann und die Tiere der Kontrollgruppe zum Sektionszeitpunkt unterschiedlich alt waren, stellt das Gehirngewicht eine bessere Bezugsgröße als das Körpergewicht dar.

Histologische Aufarbeitung der Organ- und Gewebeproben

Es wurden Ovarien, Uterus, Cervix, Vagina, Milchdrüse, Hypophyse, Nebenniere, Niere, Leber, Skelettmuskulatur (Applikationsstelle), Thymus, Darmbeinlymphknoten, Femurkopf und Sternum für die histopathologische Untersuchung entnommen. Nach der Entnahme wurden die Organe von Binde- und/oder Fettgewebe befreit und bis zum Einlegen in 4%iges Formalin mit physiologischer Kochsalzlösung angefeuchtet. Paarige Organe wurden zusammen entnommen, bei auftretenden Veränderungen wurden beide Organe aufbereitet. Die Organproben mit einer maximalen Dicke von 0,5 cm wurden in neutralgepuffertem, 4%igen Formalin fixiert. Eine Ausnahme bildete die Hypophyse, für die Bouin'sches Gemisch (15 Teile gesättigte Pikrinsäure, 5 Teile 37% Formaldehydlösung, 1 Teil Eisessig) verwendet wurde. Die Proben wurden in Paraplast® (Sherwood Medical, Norfolk, USA) eingebettet [Romeis, B. (1989b)]. Das Schneiden der Proben erfolgte mit einem Schlittenmikrotom Typ Hn (Firma Jung, Heidelberg, Deutschland). Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt [Romeis, B. (1989c)].

Die HE-gefärbten endokrinen Zielorgane wurden unter Berücksichtigung folgender Kriterien ausgewertet:

An den Ovarien wurden antrale Follikel quantitativ (pro Schnitt) und qualitativ (in den Kategorien <1, 1-2, 2-3 oder >3 mm Durchmesser) eingeteilt und pro Schnitt erfasst. Bei den CL wurde zwischen *frühem Stadium* (Corpus hämorrhagicum/rubrum), *mittlerem Stadium* (CL in Blüte) und *spätem Stadium* (Regressionskörper) sowie *Corpus albicans/Residualkörper* unterschieden.

Material und Methoden

Frühes Stadium - Als Corpus hämorrhagicum wird ein ovulierter Follikel bezeichnet, der im Zentrum aus Erythrozyten und Fibrin, in der zweiten Schicht hauptsächlich aus Erythrozyten, Bindegewebe und vereinzelt Makrophagen mit phagozytierten Blutbestandteilen und in der Peripherie aus Luteinzellen, Kapillaren und Arteriolen besteht. Ein Corpus rubrum wölbt sich über die Oberfläche des Ovars hinaus und ist durch eine bindegewebige Kapsel vom umliegenden Ovargewebe abgegrenzt. Im sich anschließenden Bereich aus proliferierenden Granulosazellen und Bindegewebe sind z. T. Fremdkörperriesenzellen zu sehen.

Mittleres Stadium - Im CL in Blüte ziehen von der umgebenden Bindegewebskapsel Bindegewebsstränge in Begleitung größerer Gefäße in das Innere. Es ist durch homogen gefärbte Luteinzellen mit einem euchromatischen Zellkern charakterisiert, wobei jede Luteinzelle von 2-4 Kapillaranschnitten umgeben ist.

Spätes Stadium - Regressionskörper besitzen eine verdickte bindegewebige Kapsel sowie breite, ins Gelbkörperinnere laufende Bindegewebsstränge. Das Zentrum bilden Arterien mit breiter Adventitia. Die noch verbleibenden Luteinzellen bestehen aus Zytoplasmaresten und spindelförmigen Zellen.

Beim *Corpus albicans/Residualkörper* füllen Arteriolen und Arterien nahezu die gesamte Querschnittsfläche aus. Jede Arterie ist von mehreren Arteriolen umgeben. Der Raum zwischen den Arteriolen wird von fischzugartig angeordnetem Bindegewebe mit spindelförmigen Zellkernen ausgefüllt. Das Corpus albicans tritt nach dem 30. Tag post ovulationem auf und besteht aus größeren arteriolen Gefäßen mit dickwandiger Adventitia. Es besteht aus zwei Zonen, in der Außenzone enthält es radiär angeordnete dichte Bindegewebsstränge. Die Gefäßanzahl nimmt von außen nach innen ab. Neben zentripetal verlaufenden Blutgefäßen finden sich Fibrozyten und Fibroblasten. Die Innenzone wird aus einem lockeren Bindegewebsnetz mit Makrophagen, Lymphozyten, Granulozyten und Fibrozyten gebildet. Die radiär angeordneten Blutgefäße weisen keine glatten Muskelzellen auf und können daher als Kapillaren eingestuft werden.

An den Uterushörnern und am Uterus wurden Zellform, Höhe des Oberflächenepithels, Anzahl der Kernreihen, Kernlage, Sekretgranula, Vakuolen, Stiftchenzellen, Leukozyten und die Regelmäßigkeit der Epithelhöhe/-oberfläche des Endometriums beurteilt. Zur Bestimmung der mittleren Epithelhöhe wurden an 5 verschiedenen Stellen pro Gesichtsfeld Messungen der endometrialen Epithelhöhe durchgeführt und insgesamt 5 Gesichtsfelder pro Präparat ausgewertet. Die Epithelhöhe wurde als Mittelwert der 25 Einzelmessungen angegeben.

Von der Cervix wurden Zellform, Epithelhöhe, Anzahl der Kernreihen, Kernlage, Sekretgranula, Stiftchenzellen und Leukozyten ermittelt. Die Messung der Epithelhöhe erfolgte analog zu der des Endometriums.

An der Vagina wurden Epithelhöhe, Schichten des Plattenepithels, Vakuolen und Leukozyten beurteilt. Die Messung der Epithelhöhe erfolgte analog zu der des Endometriums.

An der Milchdrüse wurden die Zellform, Epithelhöhe und Anzahl der Kernreihen der Alveole sowie die Leukozyten beurteilt. Die Messung der Epithelhöhe erfolgte analog zu der des Endometriums.

Die Adenohypophyse wurde auf basophile Endokrinozyten untersucht, die sich in der HE-Färbung, aufgrund ihrer hohen Affinität zu basischen Farbstoffen, blau anfärben und für die Synthese von LH und FSH verantwortlich sind.

Die übrigen Organe wurden auf histologische und histopathologische Veränderungen untersucht.

Zusätzlich wurden Knochenmarkausstriche angefertigt, bei denen Zellen der Erythrozytopoese, Granulozytopoese, Lymphozyten, Plasmazellen, Retikulumzellen und Zellen der Thrombozytopoese beurteilt wurden [Baake, M. *et al.* (1994)].

3.3 Studiendesign

3.3.1 Vorstudie

In einer Vorstudie wurden die aufgeführten Methoden zur Zyklusbestimmung am GM erprobt, um orientierende Informationen zur Beurteilung des Ovarialzyklus zu erlangen.

Nach der Akklimationsphase wurden 6 weibliche Minischweine über einen Zeitraum von 44 Tagen unter Berücksichtigung des Duldungsreflexes, der Rötung/Schwellung der Vulva, des Vaginalschleims und der Vaginalzytologie (siehe 3.2) täglich beurteilt, um die Aussagekraft der Parameter für das Zyklusgeschehen zu überprüfen (siehe Tabelle 10). Jeweils am Montag und Donnerstag erfolgte eine Ultraschalluntersuchung der Ovarien und des Uterus. Mit Einsetzen des Proestrus, der mit Einsetzen der ersten Rötung/Schwellung begann, erfolgte die erste Blutentnahme zur Hormonbestimmung. Diese wurde während der nächsten 6 Tage täglich, anschließend jeden 3. Tag und bei Wiedereinsetzen des Proestrus erneut durchgeführt (s.o). Der Estrus wurde als Auftreten des Duldungsreflexes definiert, die Zyklustage anschließend retrospektiv ermittelt. Die Tiere wurden am Versuchsende nicht getötet.

Tabelle 10: Untersuchungsschema des Zyklus sowie der Hormonbestimmung

Tag	Zyklus-tag	Duldungs-reflex	Zyklus-stand	Befund der Rötung/Schwellung	Hormon-bestimmung
Montag	-8	-	D	-	
Dienstag	-7	-	D	-	
Mittwoch	-6	-	D	-	
Donnerstag	-5	-	D	-	
Freitag	-4	-	D	-	
Samstag	-3	-	PRE	+	x
Sonntag	-2	-	PRE	+	x
Montag	-1	-	PRE	+	x
Dienstag	1	+	ES	+	x
Mittwoch	2	+	ES	+	x
Donnerstag	3	-	PE	-	x
Freitag	4	-	PE	-	
Samstag	5	-	PE	-	
Sonntag	6	-	D	-	x
Montag	7	-	D	-	
Dienstag	8	-	D	-	
Mittwoch	9	-	D	-	x
Donnerstag	10	-	D	-	
Freitag	11	-	D	-	
Samstag	12	-	D	-	x
Sonntag	13	-	D	-	
Montag	14	-	D	-	
Dienstag	15	-	D	-	x
Mittwoch	16	-	D	-	
Donnerstag	17	-	D	-	
Freitag	18	-	PRE	+	x
Samstag	19	-	PRE	+	x
Sonntag	20	+	ES	+	x
Montag	21	+	ES	+	x
Dienstag	22	-	PE	+	x
Mittwoch	23	-	PE	-	x

D – Diestrus, PRE – Proestrus, ES – Estrus, PE – Postestrus, + – Befund positiv, - – Befund negativ

3.3.2 Hauptstudie

In der Hauptstudie wurden die Untersuchungsmethoden verwendet, die sich im Vorversuch als geeignet erwiesen hatten, den Ovarialzyklus beim GM zu charakterisieren. Nicht geeignete Methoden waren die Auslösung des Duldungsreflexes durch den Menschen, die Vaginalzytologie und die Ultraschalluntersuchungen des Uterus. Die Ultraschalluntersuchungen der Ovarien und die Hormonbestimmungen wurden in Anlehnung an den Zeitplan des Vorversuchs durchgeführt. Alle Tiere wurden am Ende der Behandlung getötet und während der Sektion makroskopisch, anschließend histologisch untersucht. Hierbei lag der Fokus auf dem Reproduktionstrakt (Ovar, Uterus, Cervix, Vagina, Milchdrüse), zusätzlich wurden auch weitere Organsysteme wie Hypophyse, Nebenniere, Niere, Leber, Skelettmuskel, Thymus, Darmbeinlymphknoten, Femur/Sternum und das Knochenmark in die Untersuchung eingeschlossen.

Die Behandlungen wurden bei allen Tieren zyklussynchron begonnen. Die Studie wurde als Blockstudie, bestehend aus 3 Blöcken, durchgeführt. Ein Block setzte sich aus je 3 Tieren einer Dosisgruppe und einem Tier der Kontrollgruppe zusammen. Im ersten Block wurde die initiale Dosisgruppe behandelt, eine Festlegung der 2. und 3. Dosisstufe erfolgte anhand der Beobachtungen der laufenden Studie. Die 4 Tiere, die nach der Akklimatisation zuerst Brunstsymptome zeigten, wurden in Block 1 durch Randomisierung der Verum- oder Kontrollgruppe zugeordnet. Für Block 2 und 3 wurde analog verfahren. Mit jeder Dosisgruppe von 3 Verum behandelten Tieren wurde ein Tier der Kontrollgruppe mitgeführt.

Im Vorzyklus wurden die Tiere über die Länge eines physiologischen Zyklus mit den beschriebenen Methoden beobachtet. Im Behandlungszyklus wurden die Tiere über 24 Tage behandelt. Die Behandlung erfolgte vom 10. bis 34. Tag des jeweiligen Behandlungszyklus, damit eine Beobachtung eines Brunstzeitraumes sowie eines vollständigen Zyklus gewährleistet wurde. Die Applikation erfolgte intramuskulär an der Sitzbein- sowie Nackenmuskulatur. Die Tötung der Tiere erfolgte am 35. Versuchstag.

Der 1. Tag des Behandlungszyklus wurde mit seinem Erreichen als 1. Versuchstag definiert (Abbildung 6). Die folgenden Tage wurden kontinuierlich gezählt, die vorangegangenen Tage wurden mit -1, -2, -3, usw. bezeichnet.

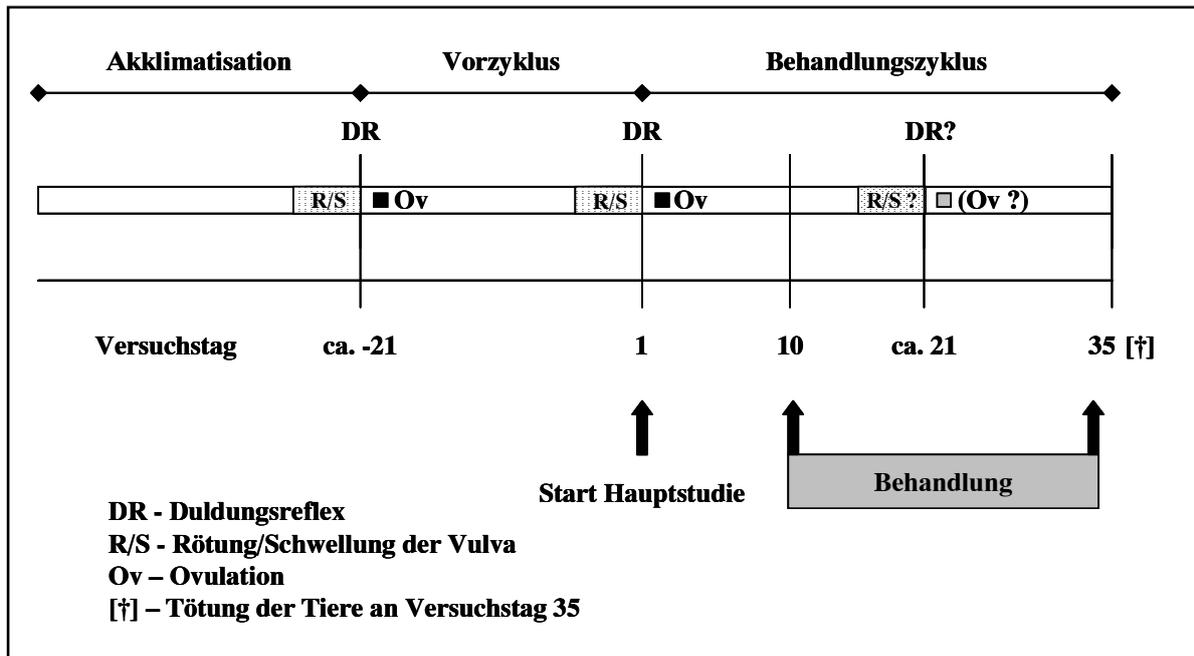


Abbildung 6: Schema des Versuchsablaufs der Hauptstudie. Mit Auftreten des ersten Duldungsreflexes nach der Akklimation begann der Vorzyklus, der nächste Duldungsreflex nach dem Vorzyklus wird als Versuchstag 1 und Beginn des Behandlungszyklus festgelegt. Die Behandlung der Kontroll- und Dosistiere erfolgte von Versuchstag 10 bis 34. Am 35. Versuchstag wurden die Tiere getötet.

Zwölf weibliche GM wurden täglich über einen Zeitraum von 24 Tagen mit einem Applikationsvolumen von 0,25 mL/kg intramuskulär behandelt. Drei unterschiedliche Dosisgruppen (0,002 mg/kg/Tag, 0,02 mg/kg/Tag und 0,1 mg/kg/Tag), bestehend aus je 3 Tieren, erhielten LNG, während den 3 verbleibenden Tieren als Kontrollgruppe die Formulierungsgrundlage verabreicht wurde. Diese bestand aus einer Mischung von Rizinusöl/Benzylbenzoat (R/B) im Verhältnis 3:1.

Da für das Minischwein bislang keine Daten im Zusammenhang mit LNG zur Verfügung standen, musste bei der Auswahl der initialen Dosis eine Eingrenzung durch Befunde anderer Spezies erfolgen. Für den Menschen liegen die LNG-Dosierungen bei Kombinationspräparaten oraler Kontrazeptiva wie Trisiston®, Miranova® oder Microgynon® zwischen 0,05 mg und 0,15 mg Gesamtdosis pro Tag. Die Orientierung die Dosiswahl der Hauptstudie erfolgte maßgeblich an der Dosis der Ratte, die ein sehr gutes Modell zur Ovulationshemmung, auch in bezug auf den Menschen, darstellt. Bei der Ratte beträgt die ovulationshemmende Dosis bei subcutaner Applikation 0,1 mg/kg/Tag (Tabelle 3). Um beim GM durch die intramuskuläre LNG-Gabe eine Ovulationshemmung hervorzurufen, wurde daher als initiale Dosis ebenfalls 0,1 mg/kg/Tag ausgewählt. Die Dosierungen wurden wöchentlich an die Veränderungen des Körpergewichts angepasst. Aufgrund der ausbleibenden Anzeichen für eine Brunst wurde die Dosis in der 2. Stufe anhand der Ultraschallbefunde um das 5-fache niedriger gewählt, um so näher in den Bereich der Schwellendosis für die Ovulationshemmung zu gelangen.

Während der Behandlung mit der 2. Dosis (0,02 mg/kg/Tag) waren ebenfalls keine Brunstanzeichen zu beobachten, daher wurde als 3. Dosierung eine 10-fach niedrigere Konzentration der 2. Dosierung gewählt. Das Behandlungsschema der Vehikel und Substanzgruppen ist in Tabelle 11 dargestellt:

Tabelle 11: Behandlungsschema

Gruppe	n	LNG-Dosisstufe (mg/kg/Tag)	Applikationsvolumen (mL/kg)	LNG-Konzentration (mg/mL)
Kontrolle	3	0 (Vehikel)	0,25	0
1 - initial	3	0,1	0,25	0,4
2	3	0,02	0,25	0,08
3	3	0,002	0,25	0,008

n – Anzahl der Tiere, mg – Milligramm, kg – Kilogramm, mL – Milliliter, LNG - Levonorgestrel

In der Behandlungszeit wurden Blutproben zur Bestimmung der LNG-Konzentration zeitgleich mit den Blutproben für die Hormonbestimmungen entnommen. Am ersten und letzten Behandlungstag wurde das Wirkstoffspiegelprofil 0, 4, 8, 12 und 24 Stunden nach der Applikation bestimmt. Eine Untersuchung gerinnungsphysiologischer, klinisch-chemischer und hämatologischer Parameter erfolgte vor und während des Behandlungszeitraumes.

Am Versuchsende wurden die Tiere getötet. Das Töten der Tiere erfolgte durch Entbluten in tiefer Allgemeinnarkose. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Art der Tötung die postmortalen Untersuchungen nicht nachhaltig beeinflusste. Als Narkoseprämedikation wurden 0,05 mL/kg Stresnil®, 0,3 mL/kg Ketavet® und 0,1 mL/kg Atropin® intramuskulär in den Oberschenkel injiziert. Zur Narkose wurden 0,3 mL/kg Rapinovel® intravenös in die Ohrvene verabreicht. Anschließend wurde mit einem Skalpell beidseits die Vena jugularis und die Arteria carotis durchtrennt. Zur besseren Entblutung wurden die Tiere dabei an den Hinterbeinen aufgehängt. Im Anschluss an die Tötung erfolgte die Sektion.

3.4 Statistik

Das Studiendesign wurde in Anlehnung an regulatorische pharmakologische/toxikologische Studien erstellt. Hierbei werden die substanzbedingten Effekte unterschiedlicher Dosisgruppen mit einer Vehikelkontrollgruppe verglichen. Von den Behörden werden in Nicht-Nagerstudien Tierzahlen von n = 3 pro Geschlecht und Gruppe für die Zulassung von Arzneimitteln als ausreichend akzeptiert. Da auf der Basis von n = 3 Tieren keine aussagekräftigen statistischen Berechnungen durchgeführt werden können, erfolgte in der vorliegenden Arbeit nur eine deskriptive Auswertung.

4 Ergebnisse

4.1 Vorversuch

Der Beobachtungszeitraum begann für die einzelnen Tiere aufgrund des individuellen Versuchsdesigns in verschiedenen Zyklusphasen. Für die Auswertung wird nur der Zeitraum von Tag -8 bis Tag 23 berücksichtigt, da hier Beobachtungsergebnisse von allen Tieren vorliegen.

4.1.1 Duldungsreflex

Der natürlich ausgelöste Duldungsreflex konnte bei allen Tieren in der ersten beobachteten Brunst an mindestens 3 aufeinander folgenden Tagen und in der 2. Brunst an mindestens 2 aufeinander folgenden Tagen ausgelöst werden. Die einzelnen Befunde sind in Tabelle 12 dargestellt. Definitionsgemäß ist der Tag des 1. Duldungsreflexes Versuchstag 1.

Tabelle 12: Vergleich natürlich und künstlich induzierter Duldungsreflexe während des Vorversuchs.

		Versuchstag																																		
		-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23				
Eber (natürlich)	T1									■	■	■																								
	T2									■	■	■	■																							
	T3									■	■	■	■	■																						
	T4									■	■	■	■	■																						
	T5									■	■	■	■	■																						
	T6									■	■	■	■	■	■																					
Msch (artifizuell)	T1									■	■	■	■	■																						
	T2									■	■	■	■	■																						
	T3									■	■	■	■	■																						
	T4									■	■	■	■	■																						
	T5									■	■	■	■	■																						
	T6									■	■	■	■	■	■																					

Duldungsreflex: vorhanden nicht vorhanden

T1-6 = Tier 1 – Tier 6, Msch - Mensch

Die auf natürliche Weise bestimmten Zykluslängen betragen 18–21 Tage, die artifiziell ermittelten Zyklen zeigten eine Länge von 19–22 Tagen (Tabelle 12). Bei Tier 3 konnte der Duldungsreflex im ersten beobachteten Brunstzeitraum durch den Menschen nicht ausgelöst werden. Alle anderen Tiere ließen bei jeder Methode unterschiedliche Zykluslängen erkennen. Dieses Ergebnis zeigt, dass die natürliche Zyklusbestimmung bei der Anzahl der ermittelten Duldungsreflexe und Zeitpunkte ein zuverlässigeres Bild als die künstliche Zyklusbestimmung bietet. Daher erfolgte die Kontrolle der Duldungsreflexe in der Hauptstudie ausschließlich durch den Eber.

4.1.2 Rötung/Schwellung der Vulva

Vulvarötungen traten zwischen Tag –6 bis Tag 7 und Tag 17 bis Tag 23 auf. In der ersten Brunst zeigten fast alle Tiere an Tag 1 und Tag 2 deutliche Vulvabefunde. Im zweiten Zeitraum traten am häufigsten zwischen Tag 19 und Tag 22 Vulvabefunde auf.

Mehr als 2 Tage anhaltende Vulvaschwellungen traten zwischen Tag –8 bis Tag 7 und Tag 17 bis Tag 23 auf. Im ersten Zeitraum zeigten alle Tiere zwischen Tag –1 und Tag 2, im zweiten Zeitraum am 21. Tag Befunde.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13: Grad der Rötung/Schwellung der Vulva während des Vorversuches.

		Versuchstag																																
		-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23		
Rötung	T1																																	
	T2																																	
	T3																																	
	T4																																	
	T5																																	
	T6																																	
Schwellung	T1																																	
	T2																																	
	T3																																	
	T4																																	
	T5																																	
	T6																																	

Rötung/Schwellung: = keine = mittel = deutlich

T1-6 = Tier 1 – Tier 6

Der mittlere Abstand der beobachteten Brunstzeiträume betrug gemessen an der Vulvarötung 21 Tage (19–23 Tage) und gemessen an der Vulvaschwellung 20 Tage (18–22 Tage). Berücksichtigt wurden Befunde dann, wenn sie an mehr als 2 aufeinanderfolgenden Tagen auftraten. In Kombination zeigte die Messung dieser beiden Parameter das Bestehen der Brunst an. Bei Verwendung nur eines Parameters war eine Brunstvorhersage im zweiten beobachteten Brunstzeitraum nicht bei allen Tieren möglich.

4.1.3 Bildung von Vaginalsehlim

Der Vaginalsehlim wurde nach Quantität (semiquantitativ), Qualität und Konsistenz beurteilt (Tabelle 14).

Vom 1. Tag bis 3. Tag trat bei 4 von 6 Tieren an allen Tagen wenig bis viel Vaginalsehlim auf (Quantität). Die verbleibenden 2 Tiere wiesen in diesem Zeitraum an 2 Tagen mittel bis viel Vaginalsehlim auf. Am Tag 2 zeigten alle Tiere mittel bis viel Vaginalsehlim. Zwischen Tag 18 und Tag 22 trat wenig Vaginalsehlim auf, der an maximal 2 aufeinander folgenden Tagen beobachtet wurde. Die Qualität des Sehlims wurde bei 5 von 6 Tieren ausschließlich trüb beurteilt, nur bei Tier 3 wurde dieser an Tag -3 und Tag 19 zusätzlich als klar beurteilt. Die Konsistenz des auftretenden Vaginalsehlims war bei 4 von 6 Tieren während des 1. Estrus stets fadenziehend. Bei den verbleibenden Tieren war der auftretende Vaginalsehlim während des 1. Estrus zwischenzeitlich flüssig. Während des 2. Estrus war die Konsistenz des auftretenden Vaginalsehlims heterogen.

Tabelle 14: Auftreten von Vaginalsehlim während des Vorversuches

		Versuchstag																																	
		-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23			
Quantität	T1																																		
	T2																																		
	T3																																		
	T4																																		
	T5																																		
	T6																																		
Qualität	T1																																		
	T2																																		
	T3																																		
	T4																																		
	T5																																		
	T6																																		
Konsistenz	T1																																		
	T2																																		
	T3																																		
	T4																																		
	T5																																		
	T6																																		

Quantität kein wenig mittel viel
 Qualität klar trüb
 Konsistenz flüssig fadenziehend

T1-6 = Tier 1 – Tier 6

Das Auftreten des Vaginalsehlims war in diesem Vorversuch ein zuverlässiger Parameter. Die darüber hinausgehende Untersuchung der Qualität und Konsistenz des Vaginalsehlims bot keine Anhaltspunkte, die zu einer weiteren Charakterisierung des Zyklus beigetragen hätten. Im Hauptversuch wurde daher nur auf das Auftreten von Vaginalsehlim (Quantität) geachtet.

4.1.4 Vaginalzytologie

Die Verteilung von Epithelzellen und Leukozyten ist in Tabelle 15 dargestellt. Das Auftreten von Epithelzellen und Leukozyten war ungleichmäßig über den Sexualzyklus verteilt. Im beobachteten Zeitraum zeigten sich keine Hinweise bzw. Befunde, die Rückschlüsse auf bestimmte Zyklusstadien ermöglichten. Daher wurde dieser Parameter im Hauptversuch nicht eingesetzt.

Tabelle 15: Anzahl Leukozyten und Epithelzellen pro Gesichtsfeld

		Versuchstag																															
		-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
Epithelzellen	T1																																
	T2																																
	T3																																
	T4																																
	T5																																
	T6																																
Leukozyten	T1																																
	T2																																
	T3																																
	T4																																
	T5																																
	T6																																

Auftreten: keine wenig (1 bis 5) mittel (5 bis 10) viel (mehr als 20)

T1-6 = Tier 1 – Tier 6

4.1.5 Ultraschalluntersuchung von Ovar und Uterus

Die Untersuchungen konnten während der Vorstudie nicht wie geplant durchgeführt werden: Wurden die Tiere fixiert, war die Bauchdecke aufgrund von Abwehrreaktionen so angespannt, dass eine deutliche Darstellung der gewünschten Reproduktionsorgane nicht erfolgen konnte. Wurden die Tiere nicht fixiert, zeigten die Minischweine nicht ausreichend Geduld, um eine ausführliche Untersuchung zuzulassen. Erst am Ende der Studie gelang es, die im Teil Material und Methoden beschriebene Untersuchungsmethode (3.2.5) zu entwickeln und auswertbare Ergebnisse zu erzielen. Da aufgrund der Häufigkeit der durchgeführten Untersuchungen (zweimal wöchentlich) auf eine Narkose der Tiere aus tierschutzrechtlichen Gründen und wegen möglicher Beeinträchtigungen der Versuchsergebnisse verzichtet wurde, konnten die Messungen nicht wie geplant durchgeführt werden. Beim Uterus konnte jeweils nur der Durchmesser des rechten bzw. linken Horns bestimmt werden. Die Messung der Endometriumhöhe war nicht möglich, da diese zu dünn war und sich per Ultraschall nicht darstellen ließ. Daher wurde auf die Darstellung und die Erfassung der Werte im Hauptversuch verzichtet. Die Ovarien ließen sich mit der entwickelten Methode gut darstellen, sodass eine Unterscheidung der Follikel und Gelbkörper erfolgen konnte. Die Untersuchung der Ovarien wurde daher im Hauptversuch durchgeführt.

4.1.6 Bestimmung der Hypophysen- und Ovarhormonkonzentrationen

Nachfolgend sind die Verläufe der Hormonkonzentrationen pro Tier dargestellt (Abbildung 7 bis Abbildung 12). Die Messwerte der Tiere 1 bis 6 sind im Anhang in Tabelle 26 bis Tabelle 31 dargestellt. Messwerte von FSH < 0,3 ng/mL, LH > 10 ng/mL, P4 < 0,5 ng/mL und E2 < 3pg/mL wurden in den Abbildungen jeweils als 0,3 ng/mL, 10 ng/mL, 0,5 ng/mL bzw. als 3 pg/mL dargestellt.

FSH

FSH im Plasma zeigte mit Ausnahme von Tier 4 an Tag 2 bis Tag 4 einen Anstieg der Konzentration. Die Maximalwerte lagen dabei zwischen 1,2 ng/mL und 7,8 ng/mL. Für den weiteren Verlauf der Beobachtung waren nur geringfügige Konzentrationsschwankungen zu beobachten. Tier 4 unterschied sich deutlich von den übrigen Tieren, da seine FSH-Konzentration während der gesamten Beobachtungszeit um das 3- bis 5-fache über jener der anderen Minischweine lag. Ursachen für den erhöhten FSH-Spiegel konnten nicht ermittelt werden.

LH

Von Tag 1 bis Tag 4 zeigte die LH-Konzentration bei allen Tieren einen deutlichen Peak. Der gemessene Maximalwert bewegte sich je nach Tier zwischen 5,5 ng/mL und oberhalb der Nachweisgrenze von 10 ng/mL. Anschließend fiel die Konzentration innerhalb von 1 bis 3 Tagen wieder auf einen Ausgangswert von ca. 1 bis 3 ng/mL zurück. Zwischen Tag 15 bis Tag 21 traten erneut Peaks auf, deren Werte zwischen 5,6 ng/mL und oberhalb der Nachweisgrenze lagen.

P4

Im Zeitraum von Tag 3 bis Tag 18 war ein deutlicher Anstieg der Progesteronkonzentration bei allen Tieren zu erkennen. Die Konzentrationen erreichten ein Maximum von 30,1 ng/mL bis 64,4 ng/mL zwischen Tag 12 und Tag 15.

E2

Alle Tiere zeigten im Zeitraum von Tag -3 bis Tag 1 einen deutlichen Anstieg von E2, der durch das schnelle Wachstum der dominanten Follikel hervorgerufen wurde. Ab der Ovulation an Tag 2 bzw. Tag 3 war ein deutlicher Abfall der Konzentration bis teilweise unterhalb der Nachweisgrenze von 3 pg/mL zu beobachten. Von Tag 15 bis Tag 21 war erneut eine Zunahme der E2-Konzentration zu beobachten, die durch die nächste Generation heranreifender Follikel produziert wurde. Bei Tier 4 wurden im Vergleich zu den übrigen Tieren die mit Abstand geringsten E2-Werte vor der Ovulation gemessen.

Die Bestimmung der Hormonkonzentrationen in dieser Vorstudie zeigte, dass der Zyklusverlauf mit dem Auftreten von Zyklusbefunden deutlich korrelierte. So traten die LH-Peaks zu Beginn des Zyklus in der Brunst auf, wenn die Sauen einen Duldungsreflex zeigten. In der 2. Hälfte des Zyklus stiegen die P4-Konzentrationen deutlich an und fielen im physiologischen Rhythmus auf einen Basalwert vor der Ovulation zurück. FSH zeigte sehr variable Werte, die nicht sehr aussagekräftig waren, die E2-Konzentrationen lagen oft unter der Nachweisgrenze. Im Hauptversuch wurde jedoch die Konzentration aller 4 Hormone bestimmt.

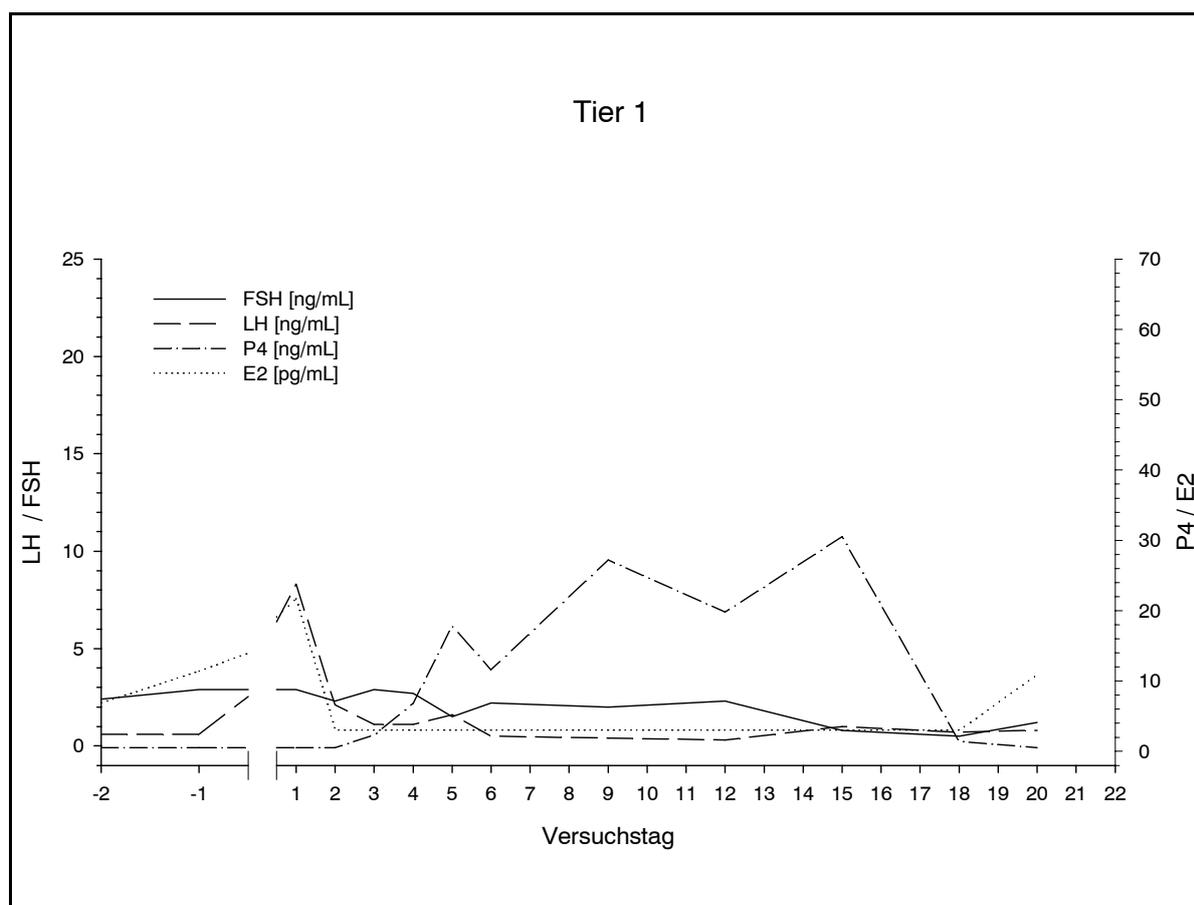


Abbildung 7: Konzentrationsverläufe von FSH, LH, P4 und E2 während des Vorversuchs von Tier 1. FSH – Follikelstimulierendes Hormon, LH – Luteinisierendes Hormon, P4 - Progesteron, E2 – 17- β -Estradiol, pg – Picogramm, ng – Nanogramm, mL - Milliliter.

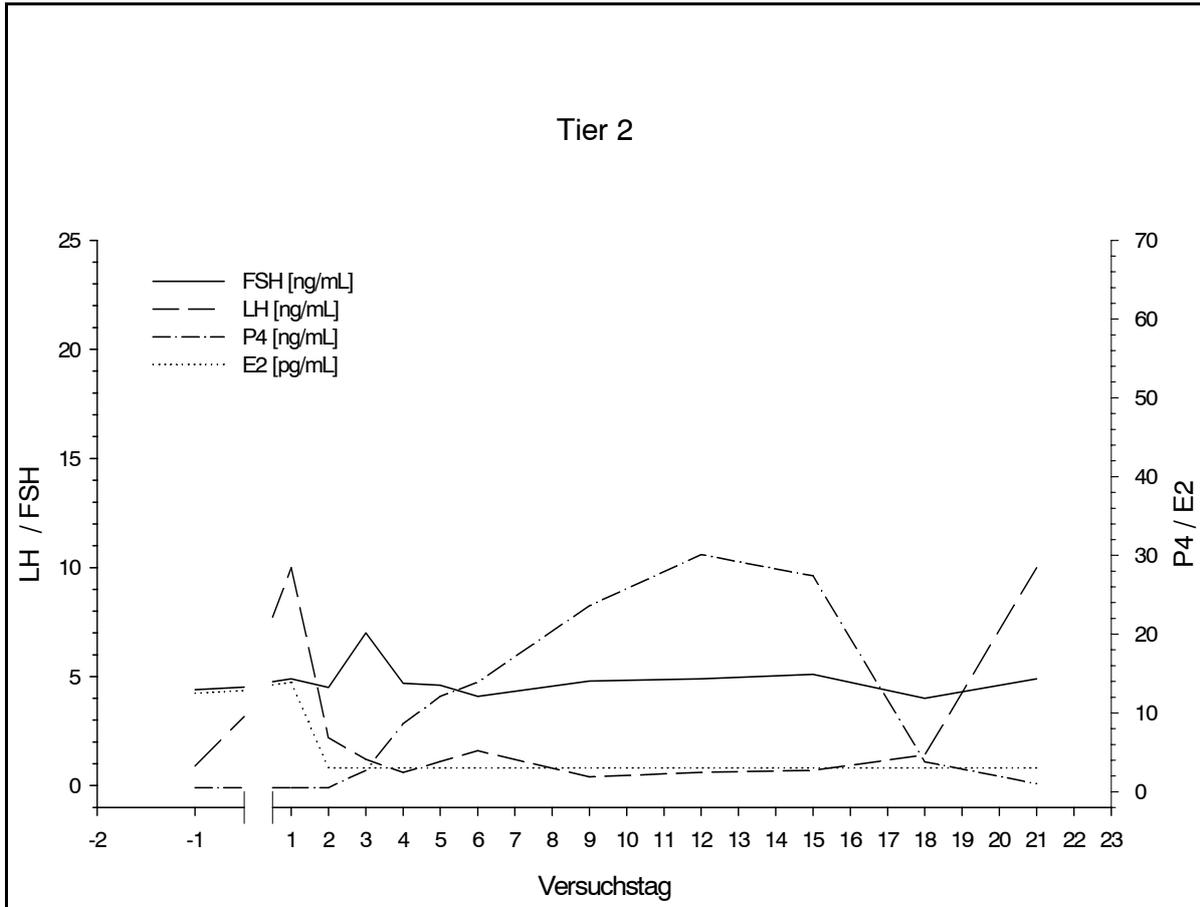


Abbildung 8: Konzentrationsverläufe von FSH, LH, P4 und E2 während des Vorversuchs von Tier 2. FSH – Follikelstimulierendes Hormon, LH – Luteinisierendes Hormon, P4 - Progesteron, E2 – 17-β-Estradiol, pg – Picogramm, ng – Nanogramm, mL - Milliliter

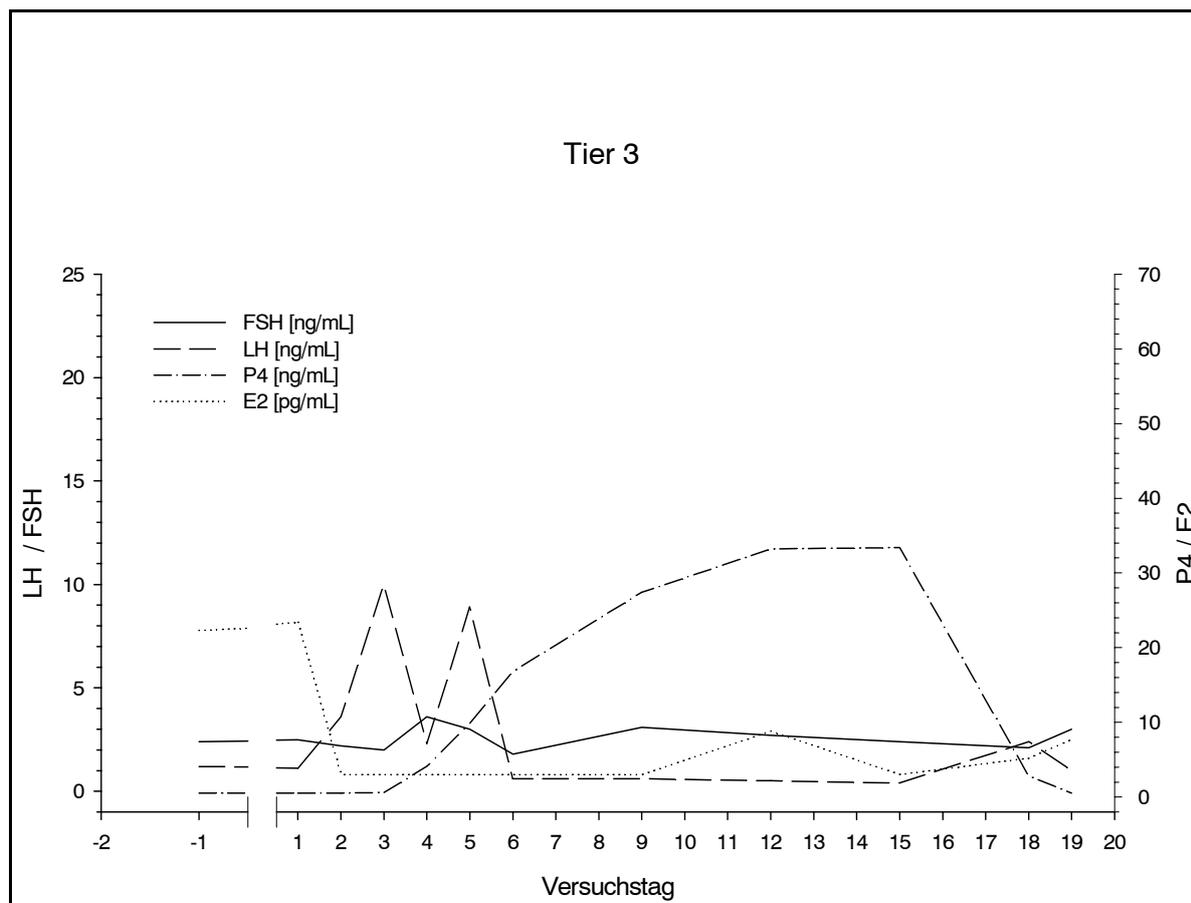


Abbildung 9: Konzentrationsverläufe von FSH, LH, P4 und E2 während des Vorversuchs von Tier 3. FSH – Follikelstimulierendes Hormon, LH – Luteinisierendes Hormon, P4 - Progesteron, E2 – 17- β -Estradiol, pg – Picogramm, ng – Nanogramm, mL - Milliliter

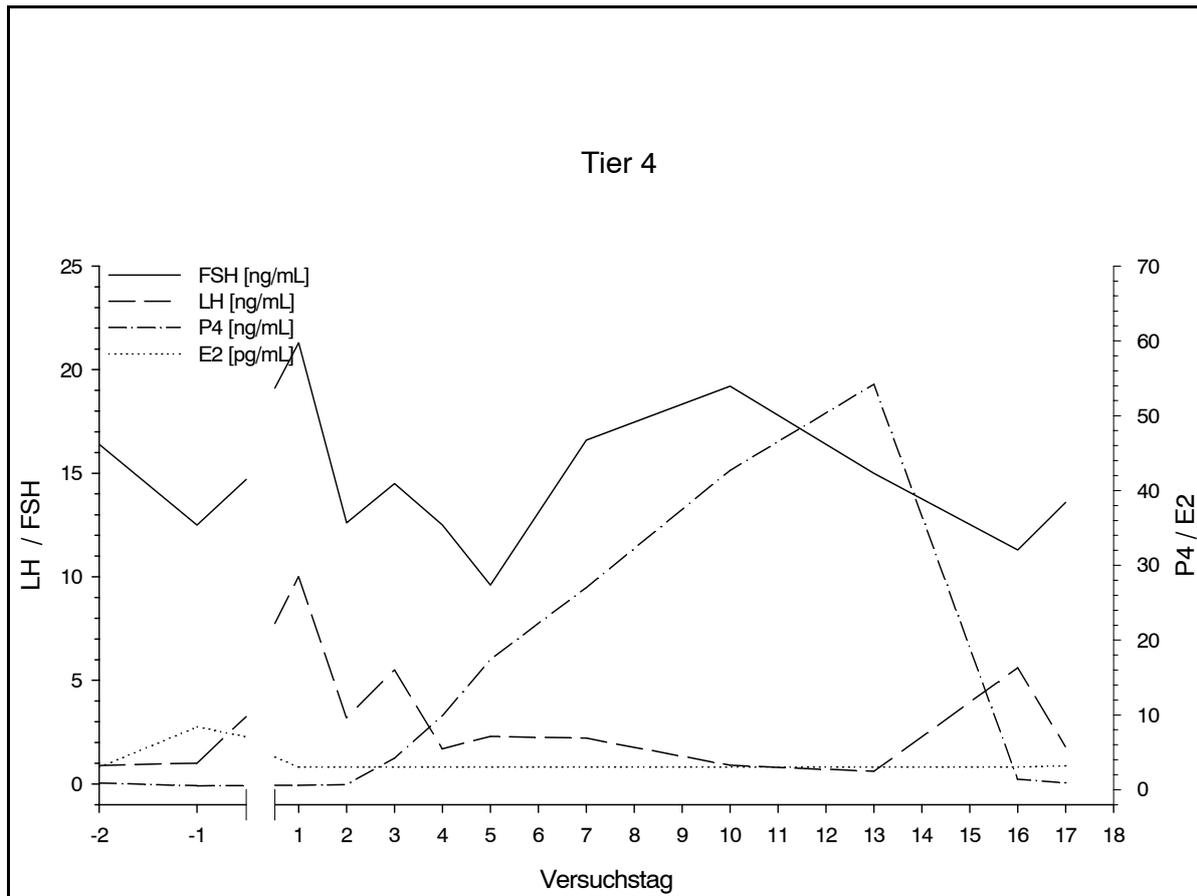


Abbildung 10: Konzentrationsverläufe von FSH, LH, P4 und E2 während des Vorversuchs von Tier 4. FSH – Follikelstimulierendes Hormon, LH – Luteinisierendes Hormon, P4 - Progesteron, E2 – 17-β-Estradiol, pg – Picogramm, ng – Nanogramm, mL - Milliliter

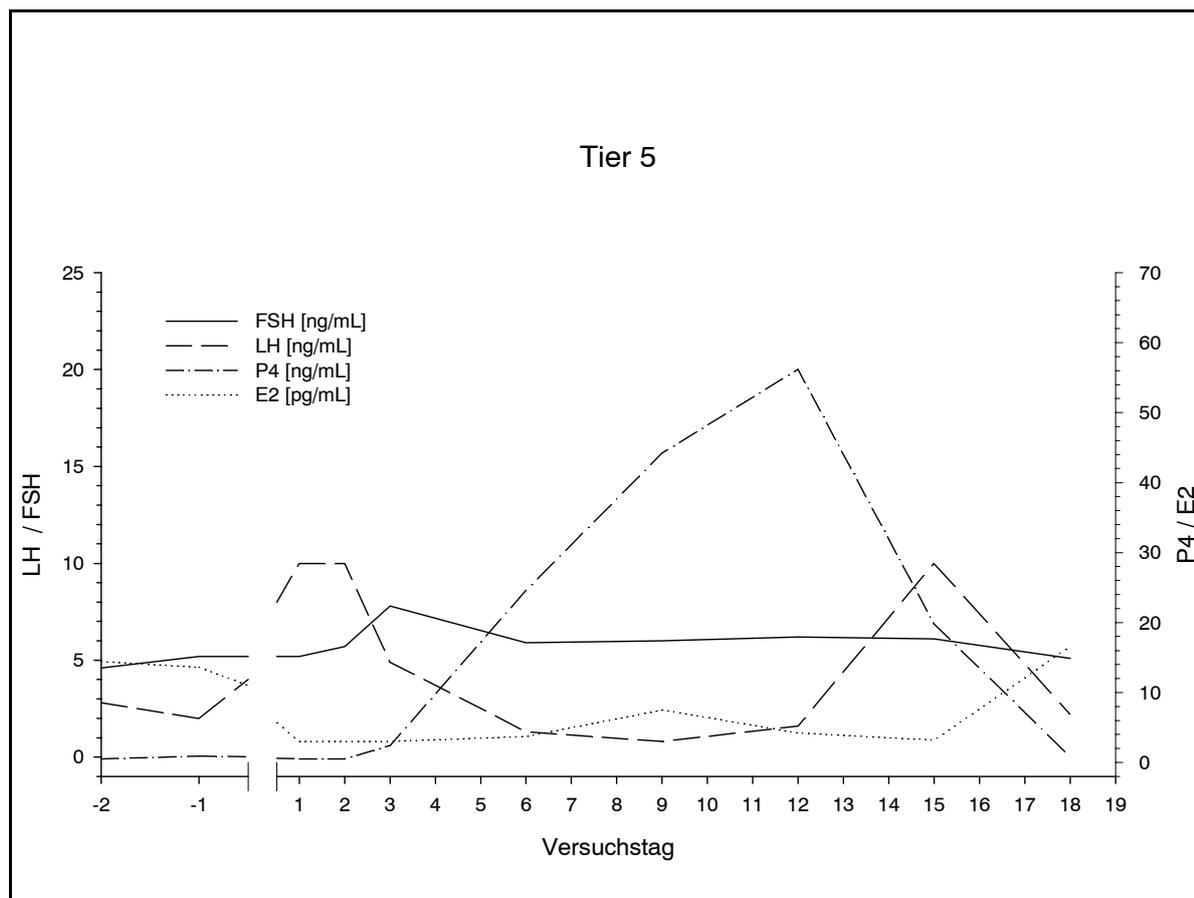


Abbildung 11: Konzentrationsverläufe von FSH, LH, P4 und E2 während des Vorversuchs bei Tier 5. FSH – Follikelstimulierendes Hormon, LH – Luteinisierendes Hormon, P4 - Progesteron, E2 – 17- β -Estradiol, pg – Picogramm, ng – Nanogramm, mL - Milliliter

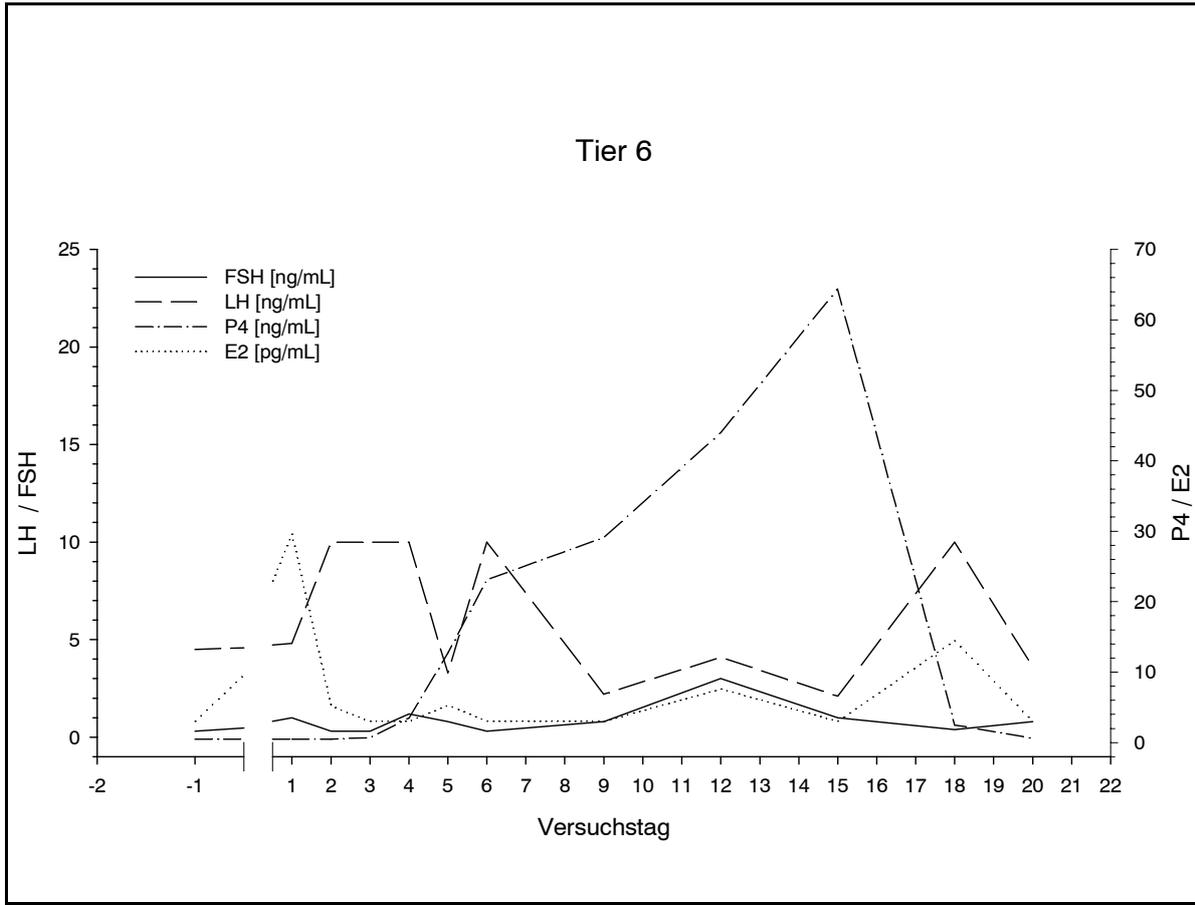


Abbildung 12: Konzentrationsverläufe von FSH, LH, P4 und E2 während des Vorversuchs von Tier 6. FSH – Follikelstimulierendes Hormon, LH – Luteinisierendes Hormon, P4 - Progesteron, E2 – 17- β -Estradiol, pg – Picogramm, ng – Nanogramm, mL - Milliliter

4.2 Hauptversuch

Der erste Tag der zweiten beobachteten Brunst war als erster Versuchstag definiert (Abbildung 6). Die Behandlung erfolgte von Tag 10 bis Tag 34, wobei die Tiere täglich intramuskulär entsprechend der Kontrollgruppe und Dosisgruppe behandelt wurden. Für die Auswertung wurden die Ergebnisse von Tag -21 bis Tag 35 berücksichtigt.

Als Dosierungen wurden initial 0,1 mg/kg/Tag LNG, anschließend 0,02 mg/kg/Tag LNG und zuletzt 0,002 mg/kg/Tag LNG eingesetzt. Die Dosierungen sind aus Gründen der Übersichtlichkeit in aufsteigenden Konzentrationen aufgeführt.

4.2.1 Duldungsreflex

Im Vorzyklus und im Zyklus zu Versuchsbeginn traten bei allen Tieren DRe auf. Während des Behandlungszeitraumes war nur in der Kontrollgruppe bei allen Tieren ein DR an mindestens zwei aufeinander folgenden Tagen, und somit eine Brunst zu beobachten. In der niedrigen Dosisgruppe zeigte nur 1 Tier an Tag 1 einen positiven DR, der per Definition nicht als Brunst bezeichnet werden konnte (Tabelle 16). In der mittleren und hohen Dosisgruppe wurden keine DRe festgestellt.

Entsprechend der DRe sind in Tabelle 17 die Zykluslängen dargestellt. Als Zykluslänge wird der Abstand zwischen den ersten DRen von zwei aufeinanderfolgender Brunstzeiträume bezeichnet. Die ermittelten Zykluslängen betragen zwischen 19 und 21 Tagen.

Ergebnisse

Tabelle 16: Natürliche Duldungsreflexe der Kontroll- und Dosistiere während des Hauptversuchs

		Versuchstag																											
		-21	-20	-19	-18	-17	-16	-15	-14	-13	-12	-11	-10	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	1	2	3	4	5	6	7
Vehikel- kontrolle	T1																												
	T2																												
	T3																												
0,002 mg/kg/ Tag LNG	T4																												
	T5																												
	T6																												
0,02 mg/kg/ Tag LNG	T7																												
	T8																												
	T9																												
0,1 mg/kg/ Tag LNG	T10																												
	T11																												
	T12																												

Tabelle 16 (Fortsetzung): Natürliche Duldungsreflexe der Kontroll- und Dosistiere während des Hauptversuchs

		Versuchstag																																																					
		LNG-Behandlungszeitraum																												8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
Vehikel- kontrolle	T1																																																						
	T2																																																						
	T3																																																						
0,002 mg/kg/ Tag LNG	T4																																																						
	T5																																																						
	T6																																																						
0,02 mg/kg/ Tag LNG	T7																																																						
	T8																																																						
	T9																																																						
0,1 mg/kg/ Tag LNG	T10																																																						
	T11																																																						
	T12																																																						

Duldungsreflex:  vorhanden LNG - Levonorgestrel, mg – Milligramm, kg – Kilogramm,

T1–12 = Tier 1 – Tier 12

Tabelle 17: Zykluslänge der Minischweine während des Hauptversuchs in Tagen

		Vorzyklus (Tag -21 bis Tag -1)	Behandlungszyklus (Tag 1 bis Tag 35)
Vehikel- kontrolle	T1	19	20
	T2	20	21
	T3	20	20
0,002 mg/kg/ Tag LNG	T4	20	..
	T5	19	(20)
	T6	20	..
0,02 mg/kg/ Tag LNG	T7	19	..
	T8	20	..
	T9	19	..
0,1 mg/kg/ Tag LNG	T10	21	..
	T11	20	..
	T12	21	..

LNG – Levonorgestrel, mg – Milligramm, kg – Kilogramm, .. kein Duldungsreflex ausgelöst, Zykluslänge nicht bestimmbar, T1–12 = Tier 1 – Tier 12, () – nicht als Zykluslänge verwendbar, da Duldungsreflex nur einmal auftrat.

Ergebnisse

4.2.2 Rötung der Vulva

Um Tag -21/-20 und Tag -1/1 waren bei allen Tieren mit Ausnahme von Tier 5 (mittlere Rötung bei Gabe von 0,002 mg/kg/Tag LNG) deutliche Rötungen zu beobachten. Während des Behandlungszeitraums waren um Tag 21 nur in der Kontroll- und der niedrigen Dosisgruppe (0,002 mg/kg/Tag LNG) Befunde zu beobachten. Die mit LNG behandelten Tiere wiesen nur mittlere Rötungen auf, während bei den Kontrolltieren deutliche Rötungen vorhanden waren. In der 0,1 mg/kg/Tag LNG-Dosierung traten während der Behandlungszeit nur bei zwei Tieren Rötungen mittleren Grades an jeweils nur einem Behandlungstag (Tag 15, 26) (siehe Tabelle 18) auf.

Tabelle 18: Vulvarötung der Kontroll- und Dosistiere während des Hauptversuchs

		Versuchstag																												
		-21	-20	-19	-18	-17	-16	-15	-14	-13	-12	-11	-10	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	1	2	3	4	5	6	7	
Vehikel-kontrolle	T1	■	■																			■	■	■	■					
	T2																						■	■	■	■				
	T3	■	■																				■	■	■	■				
0,002 mg/kg/Tag LNG	T4																						■	■	■	■				
	T5																							■	■	■	■			
	T6	■	■																				■	■	■	■				
0,02 mg/kg/Tag LNG	T7	■	■																				■	■	■	■				
	T8	■	■																				■	■	■	■				
	T9	■	■																				■	■	■	■				
0,1 mg/kg/Tag LNG	T10																													
	T11																													
	T12																													

Tabelle 18 (Fortsetzung): Vulvarötung der Kontroll- und Dosistiere während des Hauptversuchs

		Versuchstag																											
		LNG-Behandlungszeitraum																											
		8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
Vehikel-kontrolle	T1																												
	T2																												
	T3																												
0,002 mg/kg/Tag LNG	T4																												
	T5																												
	T6																												
0,02 mg/kg/Tag LNG	T7																												
	T8																												
	T9																												
0,1 mg/kg/Tag LNG	T10																												
	T11																												
	T12																												

Grading: keine mittlere deutliche; LNG – Levonorgestrel, mg – Milligramm, kg – Kilogramm, T1 – 12 = Tier 1 – Tier 12

Bei den einzelnen Rötungen handelte es sich möglicherweise um Spontanbefunde. Da diese nur einmalig und zudem außerhalb des erwarteten Brunstzeitraumes (um Tag 21) auftraten und mit Befunden anderer Parameter nicht in Zusammenhang standen, wurden ihnen keine weitere Bedeutung beigemessen.

4.2.3 Schwellung der Vulva

Um Tag -21 bis -19 sowie an Tag -1 waren bei fast allen Tieren mit Ausnahme von Tier 5 mittlere bis deutliche Schwellungen zu beobachten. Tier 5 (0,002 mg/kg/Tag LNG) wies um den Zeitraum der 2. beobachteten Brunst (um Tag -2) keine Schwellung auf. Im Behandlungszeitraum waren nur in der Kontrollgruppe zwischen Tag 19 und 23 mittlere bis deutliche Schwellungen zu erkennen (Tabelle 19). Die Tiere der Dosisgruppen zeigten keine Schwellungen.

Tabelle 19: Vulvaschwellungen der Kontroll- und Dosistiere während des Hauptversuchs

		Versuchstag																											
		-21	-20	-19	-18	-17	-16	-15	-14	-13	-12	-11	-10	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	1	2	3	4	5	6	7
Vehikelkontrolle	T1	■	■	■	■	■																							
	T2	■	■	■	■	■																							
	T3	■	■	■	■	■																							
0,002 mg/kg/Tag LNG	T4	■	■	■	■	■																							
	T5	■	■	■	■	■																							
	T6	■	■	■	■	■																							
0,02 mg/kg/Tag LNG	T7	■	■	■	■	■																							
	T8	■	■	■	■	■																							
	T9	■	■	■	■	■																							
0,1 mg/kg/Tag LNG	T10	■	■	■	■	■																							
	T11	■	■	■	■	■																							
	T12	■	■	■	■	■																							

Tabelle 19 (Fortsetzung): Vulvaschwellungen der Kontroll- und Dosistiere während des Hauptversuchs

		Versuchstag																											
		LNG-Behandlungszeitraum																											
		8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
Vehikelkontrolle	T1																												
	T2																												
	T3																												
0,002 mg/kg/Tag LNG	T4																												
	T5																												
	T6																												
0,02 mg/kg/Tag LNG	T7																												
	T8																												
	T9																												
0,1 mg/kg/Tag LNG	T10																												
	T11																												
	T12																												

Grading: keine mittlere deutliche; LNG – Levonorgestrel, mg – Milligramm, kg - Kilogramm, T1 - 12 = Tier 1 - Tier 12

Ergebnisse

Die Schwellungsbefunde zeigten ein ähnliches Bild wie die Rötungen. Bei den Tieren der Dosisgruppen waren die Vulvarötungen stärker ausgeprägt als die Vulvaschwellungen. So waren zum Zeitpunkt der mittleren Rötungen keine Schwellungen bei Tier 5 zu beobachten. Die Tiere der niedrigen Dosisgruppe (0,002 mg/kg/Tag LNG) zeigten zwischen Tag 19 bis Tag 23 nur mittlere Vulvarötungen aber keine Schwellungen.

4.2.4 Bildung von Vaginalsehlein

Um Tag -21/-20 und Tag 1 traten bei fast allen Tieren wenig bis viel Vaginalsehlein auf, Tier 2 (Kontrolle) zeigte an Tag 1 keinen Vaginalsehlein. Während der Behandlungszeit um den Tag 21 konnte in der Kontrollgruppe und der niedrigen Dosisgruppe sowie vereinzelt außerhalb dieses Zeitraumes in der mittleren und hohen Dosisgruppe Vaginalsehlein beobachtet werden (siehe Tabelle 20).

Tabelle 20: Quantität an Vaginalsehlein der Kontroll- und Dostiere während des Hauptversuches

		Versuchstag																											
		-21	-20	-19	-18	-17	-16	-15	-14	-13	-12	-11	-10	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	1	2	3	4	5	6	7
Vehikel-kontrolle	T1	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	T2	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	T3	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
0,002 mg/kg/Tag LNG	T4	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	T5	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	T6	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
0,02 mg/kg/Tag LNG	T7	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	T8	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	T9	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
0,1 mg/kg/Tag LNG	T10	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	T11	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	T12	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

Ergebnisse

Insgesamt waren die Befunde des Vaginalschleims deutlich unregelmäßiger, weniger zusammenhängend und somit weniger aussagekräftig als die der Rötung und Schwellung der Vulva. Tier 2 zeigte in der erwarteten Brunstperiode von Tag -3 bis Tag 3 keinen Vaginalschleim jedoch deutliche Rötungen und Schwellungen.

4.2.5 Ultraschalluntersuchung des Ovars

Tabelle 21 zeigt die Ergebnisse der Ultraschalluntersuchungen. Zwischen Versuchstag -18 bis -4 konnten bei allen Tieren der 0,002 mg/kg/Tag und 0,02 mg/kg/Tag Dosisgruppe Gelbkörper beobachtet werden. Tier 1, 10, 11 und 12 konnten aus technischen Gründen erst ab Versuchstag 1 per Ultraschall untersucht werden.

Im Behandlungszeitraum nahm die Zahl der Gelbkörper zum Versuchstag 21/22 hin ab. In der mittleren und hohen LNG-Dosis traten bei fast allen Tieren bis zum Ende des Behandlungszeitraums keine erneuten Gelbkörper auf. Eine Ausnahme bildete Tier 12, bei dem an Tag 31 ein einzelner Gelbkörper diagnostiziert wurde. Bei der Sektion konnte dieser Befund nicht bestätigt werden.

Tabelle 21: Anzahl der Gelbkörper der Kontroll- und Dosistiere des Hauptversuchs

		Versuchstag																							
		-21	-19	-18	-17	-16	-15	-14	-12	-11	-10	-9	-8	-7	-5	-4	-3	-2	-1	1	3	4	5	6	7
Vehikel-kontrolle	T1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1			
	T2										5			1											
	T3			1				4		3				5		4							2		
0,002 mg/kg/Tag LNG	T4				1			5			9			4									3		
	T5									4			4												4
	T6						3		3				7												4
0,02 mg/kg/Tag LNG	T7					3		2					4		1										1
	T8						3			2			2										2		
	T9											1			1							3			4
0,1 mg/kg/Tag LNG	T10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2			
	T11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				2
	T12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				

Tabelle 21 (Fortsetzung): Anzahl der Gelbkörper der Kontroll- und Dosistiere des Hauptversuchs

		Versuchstag																											
		LNG-Behandlungszeitraum																											
		8	10	11	12	13	14	15	17	18	19	20	21	22	24	25	26	27	28	29	31	32	33	34	35				
Vehikel-kontrolle	T1				1			2									4									3			
	T2		3			6			4													4				9			
	T3	3		6				5								5					5		2						
0,002 mg/kg/Tag LNG	T4	6			1			4									5				6				9				
	T5			5			5			2						5				2			5			7			
	T6		4				4		3						2					6		3				5			
0,02 mg/kg/Tag LNG	T7		4				7		3				4																
	T8	5			7			6			2																		
	T9			4			4				2																		
0,1 mg/kg/Tag LNG	T10			3				2																					
	T11			3																									
	T12		4			3																			1				

Tag, an dem eine Ultraschalluntersuchung durchgeführt wurde

Ultraschalluntersuchung nicht möglich

LNG – Levonorgestrel, T1 – 12 = Tier 1 – Tier 12, mg – Milligramm, kg – Kilogramm

Ergebnisse

Die Ultraschalluntersuchungen zeigten ab dem 25. Versuchstag das Ausbleiben einer erneuten Gelbkörperbildung in der mittleren und hohen Dosisgruppe im Gegensatz zur Kontrolle und der niedrigen Dosisgruppe. In der hohen Dosisgruppe wurde ein Gelbkörper an Tag 31 beobachtet, im Blut war kein Anstieg der P4-Konzentration zu erkennen. Daher wurde der Befund nicht als Gelbkörper, sondern als unbekannter Funktionskörper interpretiert. Bei der Sektion wurden keine Auffälligkeiten an den Ovarien dieses Tieres beobachtet.

4.2.6 Bestimmung der endogenen Hypophysen- und Ovarhormonkonzentrationen

Die Messwerte der Tiere 1 bis 6 sind im Anhang in Tabelle 37 bis Tabelle 40 dargestellt. Messwerte von FSH < 3 ng/mL, LH > 10 ng/mL, P4 $< 0,5$ ng/mL und E2 < 3 pg/mL wurden in den Abbildungen jeweils als 3 ng/mL, 10 ng/mL, 0,5 ng/mL bzw. als 3 pg/mL dargestellt.

Vehikelkontrolle (0 mg/kg/Tag LNG)

Nachfolgend sind in den Abbildungen 13 bis 15 die Verlaufskurven der Hormonkonzentrationen der einzelnen Tiere der Kontrollgruppe dargestellt.

Die FSH-Konzentrationen in der Kontrollgruppe zeigten eine überwiegend gleichmäßige, wellenförmige Dynamik, verglichen mit den anderen Hormonen waren die Zykluskonzentrationen weniger zyklusspezifisch. Maximale Konzentrationen wurden um Tag -17 bzw. 11 und Tag 22–32 gemessen. Die Werte von Tier 1 lagen dabei besonders an Tag 22 deutlich höher als von Tier 2 und Tier 3.

Die LH-Konzentrationen aller Tiere zeigten einen deutlichen Peak um Tag -21 , 1–2 und 20–22, wobei die maximale Konzentration von Tier 1 an Tag 1–2 (5,7 ng/mL LNG) um ca. den Faktor 2 geringer war (siehe Abbildung 13) als die Konzentration von Tier 2 und Tier 3 in Abbildung 15 und 16 (> 10 ng/mL).

Progesteron zeigte von allen 4 gemessenen Hormonen die deutlichste und gleichmäßigste Dynamik. Maximale Werte konnten in den Zeiträumen von Tag -11 bis Tag -9 , Tag 11 bis Tag 15 und Tag 29 bis Tag 34 gemessen werden. Relativ betrachtet zeigten aber alle Tiere an Tag -21 , Tag -1 und Tag 19–21 Konzentrationspeaks.

Bei den E2-Konzentrationen zeigten sich bei Tier 1 vielfach erhöhte Werte im Gegensatz zum Rest der Gruppe. An den übrigen Versuchstagen lagen die Werte der Tiere 2 und 3 meistens unterhalb des messbaren Bereichs.

Bei allen Tieren der Kontrollgruppe zeigten die Hormonkonzentrationen über die gesamte Versuchszeit einen physiologischen Zyklus.

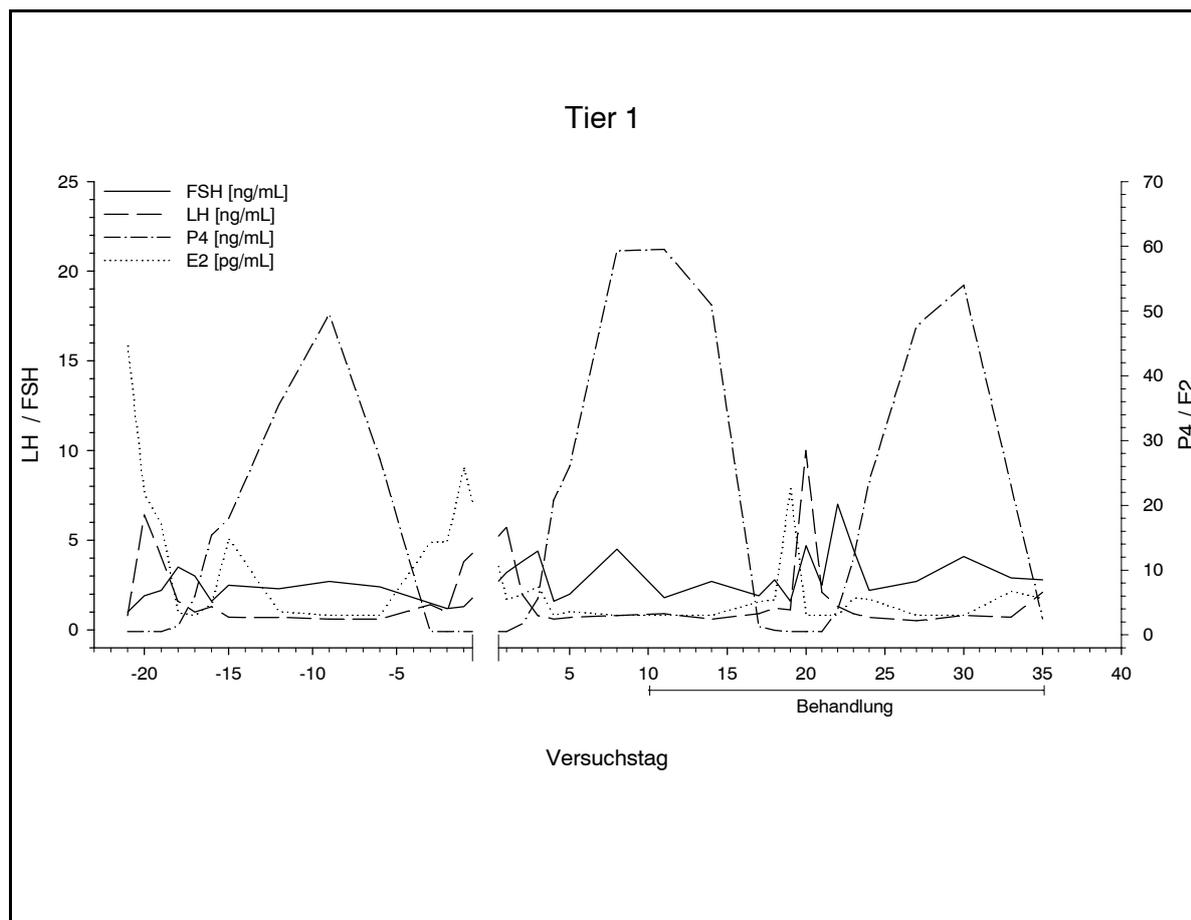


Abbildung 13: Hormonkonzentrationen von Tier 1 (Kontrolle) während des Hauptversuchs. FSH - Follikelstimulierendes Hormon, LH - Luteinisierendes Hormon, P4 - Progesteron, E2 - 17- β -Estradiol, pg - Picogramm, ng - Nanogramm, mL - Milliliter

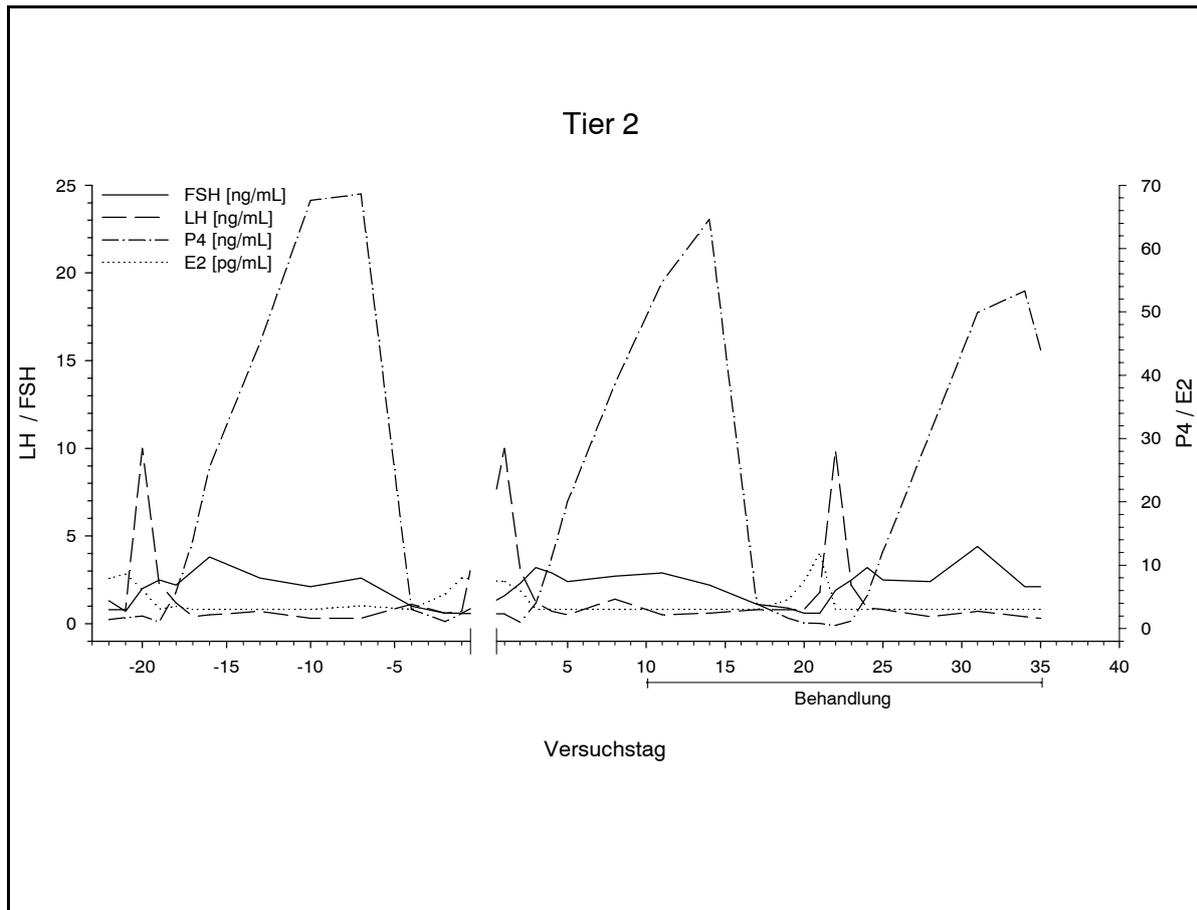


Abbildung 14: Hormonkonzentrationen von Tier 2 (Kontrolle) während des Hauptversuchs. FSH - Follikelstimulierendes Hormon, LH – Luteinisierendes Hormon, P4 - Progesteron, E2 – 17- β -Estradiol, pg – Picogramm, ng - Nanogramm, mL - Milliliter

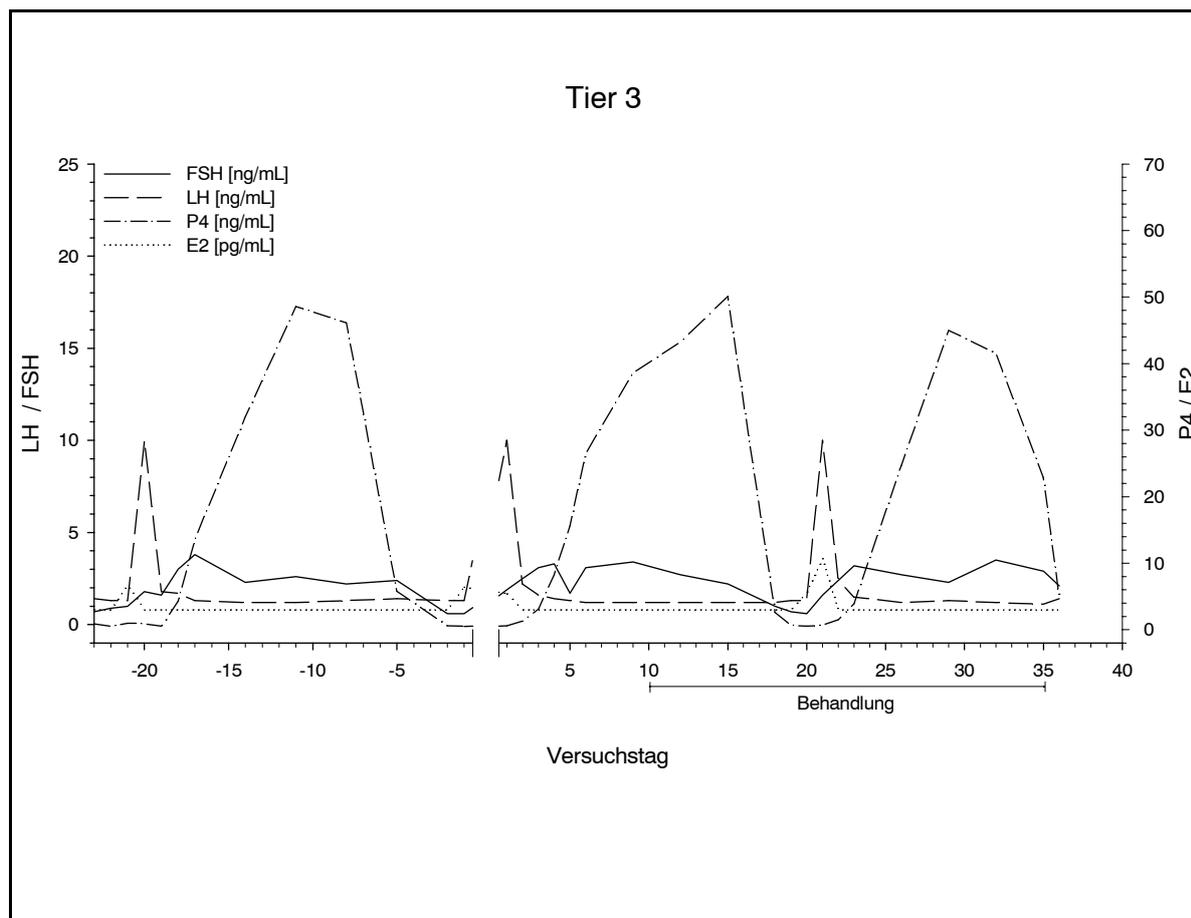


Abbildung 15: Hormonkonzentrationen von Tier 3 (Kontrolle) während des Hauptversuchs. FSH - Follikelstimulierendes Hormon, LH – Luteinisierendes Hormon, P4 - Progesteron, E2 – 17- β -Estradiol, pg – Picogramm, ng - Nanogramm, mL - Milliliter

Niedrige Dosisgruppe (0,002 mg/kg/Tag LNG)

Nachfolgend sind in den Abbildungen 14 bis 16 die Verlaufskurven der Hormonkonzentrationen der niedrigen Dosisgruppe dargestellt.

Die FSH-Konzentrationen in der niedrigen Dosisgruppe zeigten eine gleichmäßige, wellenförmige und zyklusabhängige Dynamik, ähnlich jener der Kontrollgruppe. Maximale Werte wurden an den Tagen -19 bis -18, 4 bis 15 und 22 bis 28 gemessen. Tier 5 zeigte an Tag 4 transiente ca. 2-fach so hohe Werte wie Tier 4 und 6.

Die LH-Konzentrationen der niedrigen Dosis zeigten an Tag -21 bis Tag 19, Tag -1 bis Tag 2 und Tag 20 bis Tag 22 deutliche Peaks. Bei Tier 5 trat kein deutlicher LH-Peak an Tag -2 bis Tag 1 auf. Die maximalen Werte lagen bei allen Tieren der niedrigen Dosisgruppe insgesamt nur einen Tag auseinander, was zeigt, dass die Zykluslänge der Tiere sehr ähnlich war.

Progesteron zeigte, wie schon in der Kontrollgruppe, die deutlichste Zyklusabhängigkeit. Maximale Werte wurden in den Zeiträumen von Tag -12 bis Tag -6, Tag 10 bis Tag 14 und Tag 31 bis Tag 34 gemessen.

Die E₂-Konzentrationen ließen aufgrund mangelnder Messgenauigkeit keine Dynamik über den Zyklus erkennen. Nur an den Tagen -22 bis -20, Tag -2 bis Tag -1 und Tag 19 bis Tag 21 lagen die Werte oberhalb der Nachweisgrenze von >3 pg/mL. Tier 4 zeigte in dieser Zeit die mit Abstand höchsten Werte von bis zu ca. 20 pg/mL an Tag -1, während die anderen Tiere nicht über 7,5 pg/mL und 4 pg/mL an Tag 20 bzw. Tag 21 hinauskamen.

Bei allen Tieren der 0,002 mg/kg/Tag LNG-Dosisgruppe zeigten die Hormonkonzentrationen über die gesamte Versuchszeit einen physiologischen Zyklusverlauf.

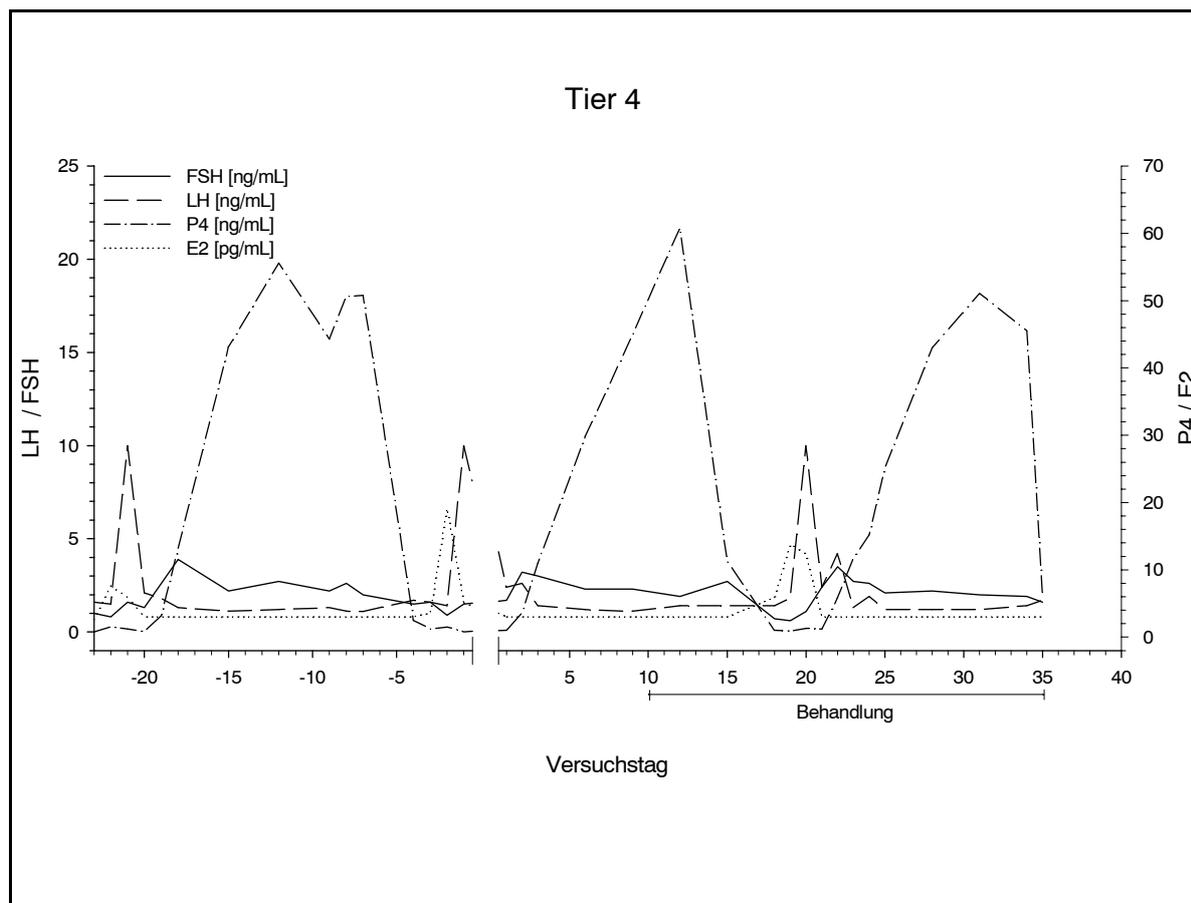


Abbildung 16: Hormonkonzentrationen von Tier 4 (0,002 mg/kg/Tag LNG) während des Hauptversuchs. FSH - Follikelstimulierendes Hormon, LH – Luteinisierendes Hormon, P4 - Progesteron, E2 – 17- β -Estradiol, pg – Picogramm, ng - Nanogramm, mL - Milliliter

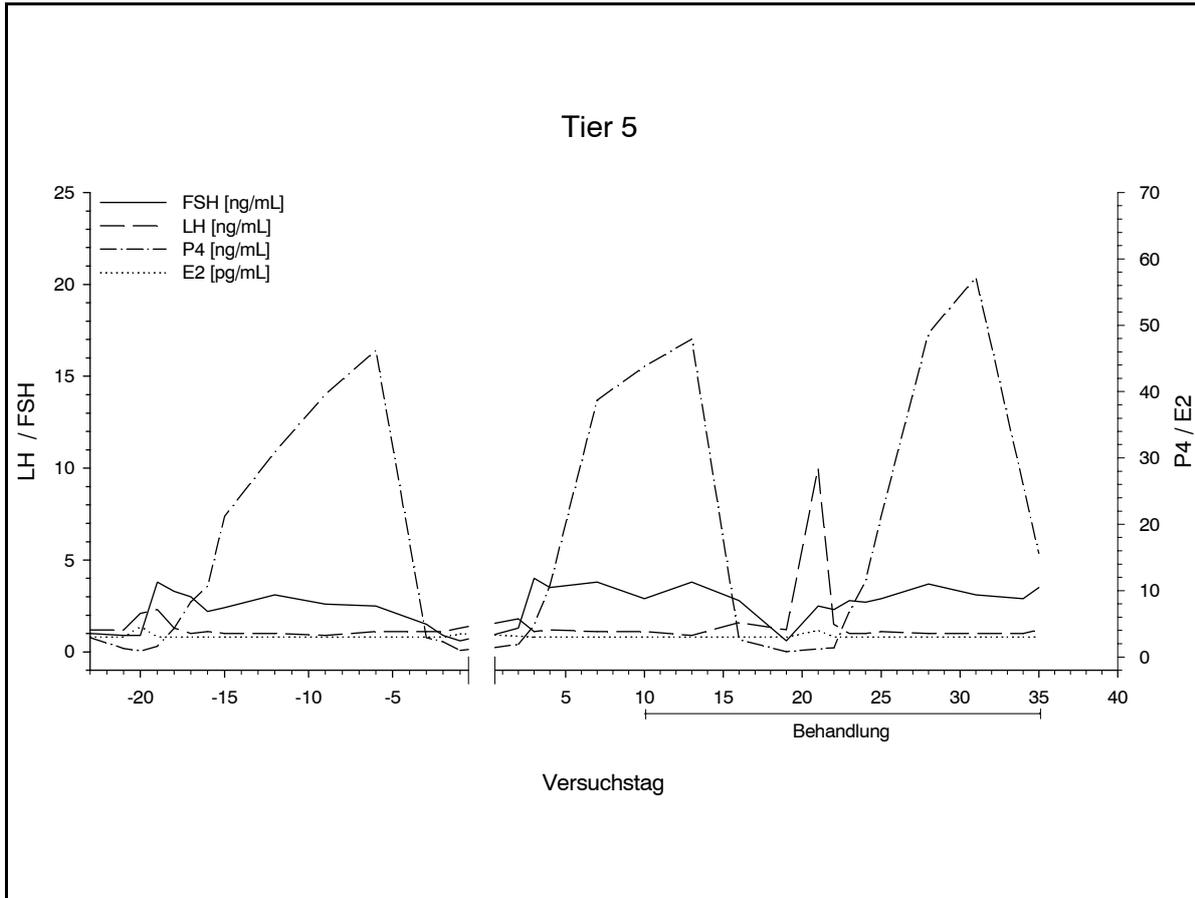


Abbildung 17: Hormonkonzentrationen von Tier 5 (0,002 mg/kg/Tag LNG) während des Hauptversuchs. FSH - Follikelstimulierendes Hormon, LH – Luteinisierendes Hormon, P4 - Progesteron, E2 – 17-β-Estradiol, pg – Picogramm, ng - Nanogramm, mL - Milliliter

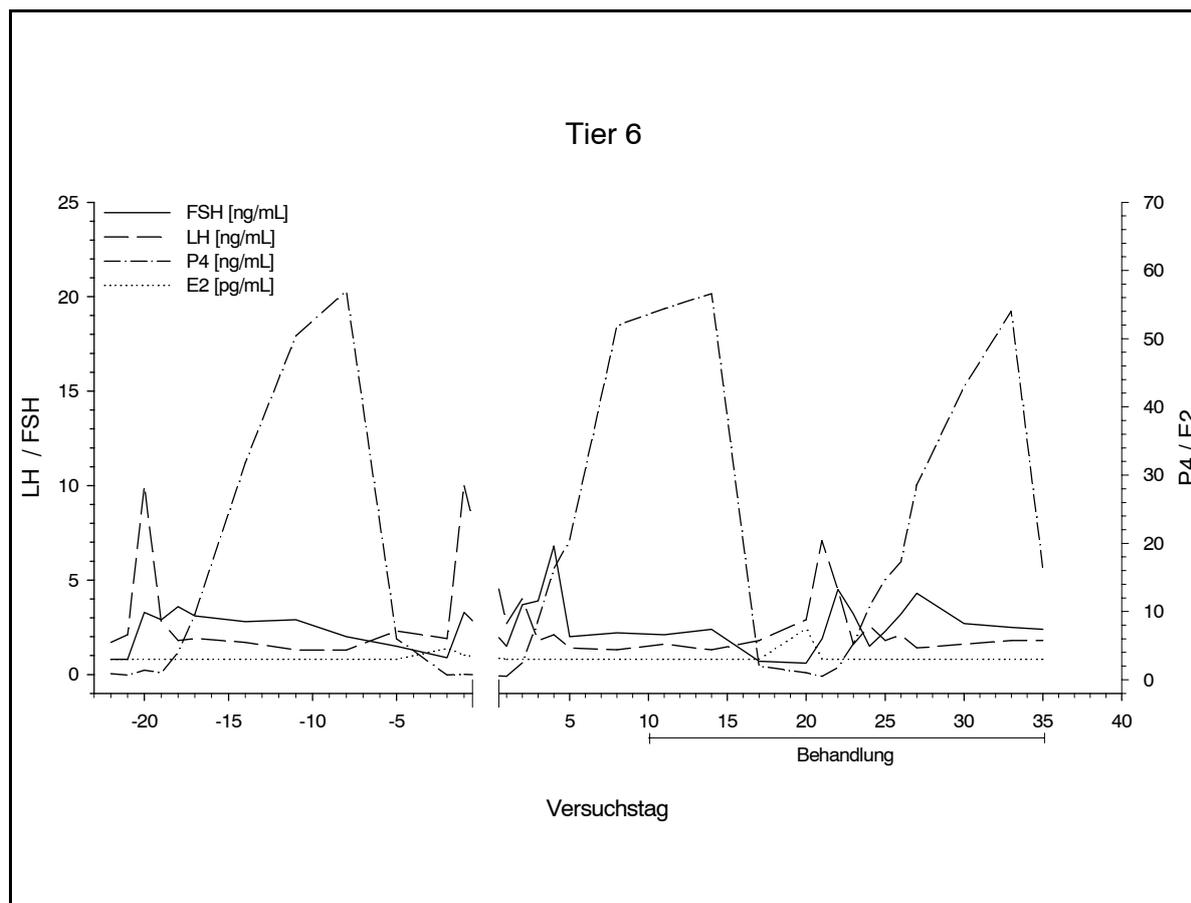


Abbildung 18: Hormonkonzentrationen von Tier 6 (0,002 mg/kg/Tag LNG) während des Hauptversuchs. FSH - Follikelstimulierendes Hormon, LH – Luteinisierendes Hormon, P4 - Progesteron, E2 – 17- β -Estradiol, pg – Picogramm, ng - Nanogramm, mL - Milliliter

Mittlere Dosisgruppe (0,02 mg/kg/Tag LNG)

Nachfolgend sind in den Abbildungen 20 bis 22 die Verlaufskurven der Hormonkonzentrationen der mittleren Dosisgruppe dargestellt.

Die FSH-Konzentrationen in der mittleren Dosisgruppe zeigten eine gleichmäßige, wellenförmige und bis Tag 13 eine zyklusabhängige Dynamik. Maximale Werte wurden an den Tagen –18 bis Tag –6 und Tag 3 bis Tag 13 gemessen. Ab Tag 13 waren bei keinem Tier eindeutig zyklusabhängige Konzentrationsanstiege zu beobachten.

Die LH-Konzentrationen stiegen an den Tagen –20 bis –19 und –1 bis 2 auf ihre Maximalwerte an. Nach Einsetzen der Behandlung wurden keine deutlichen Peaks im zu erwartenden Zeitraum (um Tag 21) beobachtet. Nur bei Tier 8 war an Tag 34 ein LH-Peak zu beobachten.

Die Progesteron-Werte stiegen im Zeitraum von Tag –10 bis Tag –6 und 11 bis 14 maximal an. In der weiteren Behandlungszeit war bei keinem Tier ein Anstieg der P4-Konzentration zu erkennen.

Die E2-Konzentrationen lagen auch in dieser Gruppe unterhalb der Nachweisgrenze. Nur an den Tagen –21 bis –19 und –2 bis 1 konnten Werte gemessen werden.

Bei allen Tieren der mittleren Dosisgruppe zeigten die Hormonkonzentrationen einen physiologischen Zyklus vor der Behandlung. Unter der Behandlung mit LNG konnte bei keinem der Tiere in der mittleren Dosisgruppe das typisch zyklusabhängige Hormonprofil beobachtet werden.

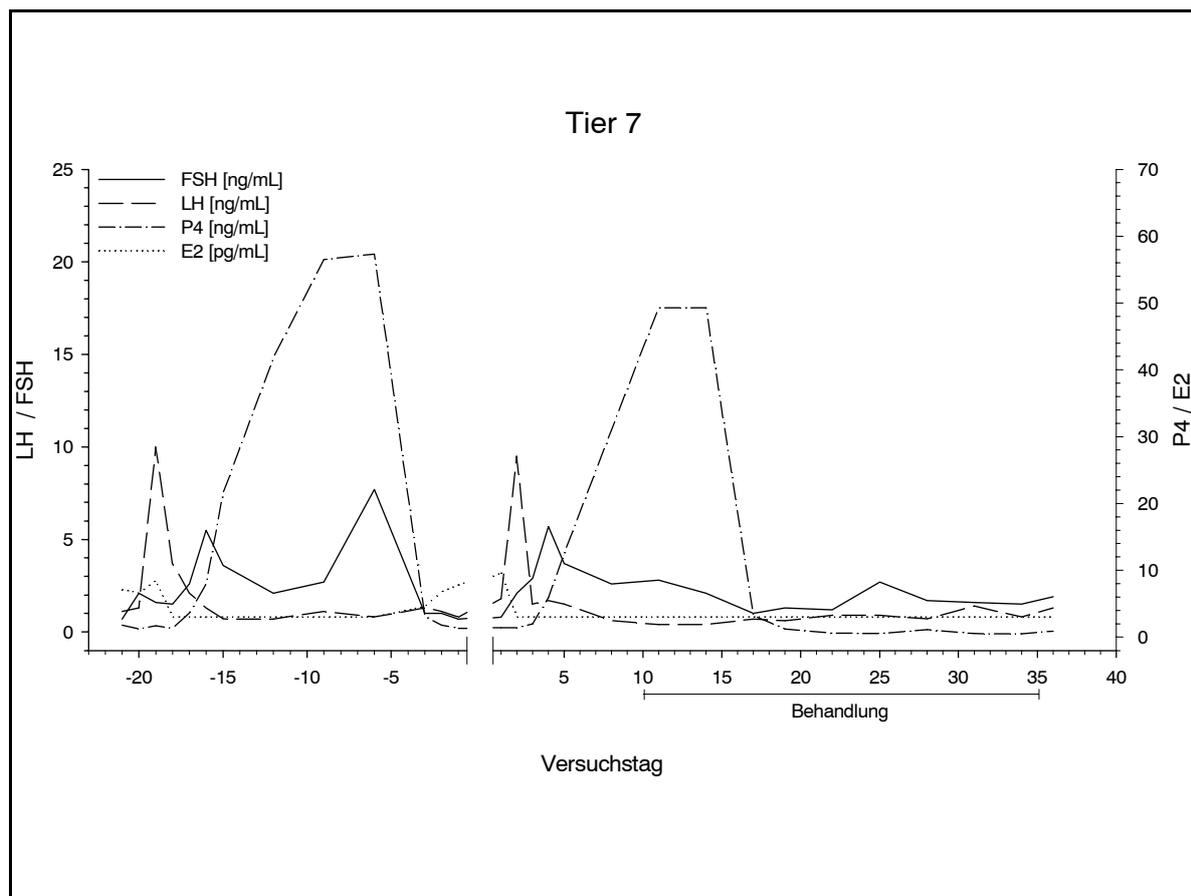


Abbildung 19: Hormonkonzentrationen von Tier 7 (0,02 mg/kg/Tag LNG) während des Hauptversuchs. FSH - Follikelstimulierendes Hormon, LH – Luteinisierendes Hormon, P4 - Progesteron, E2 – 17- β -Estradiol, pg – Picogramm, ng - Nanogramm, mL - Milliliter

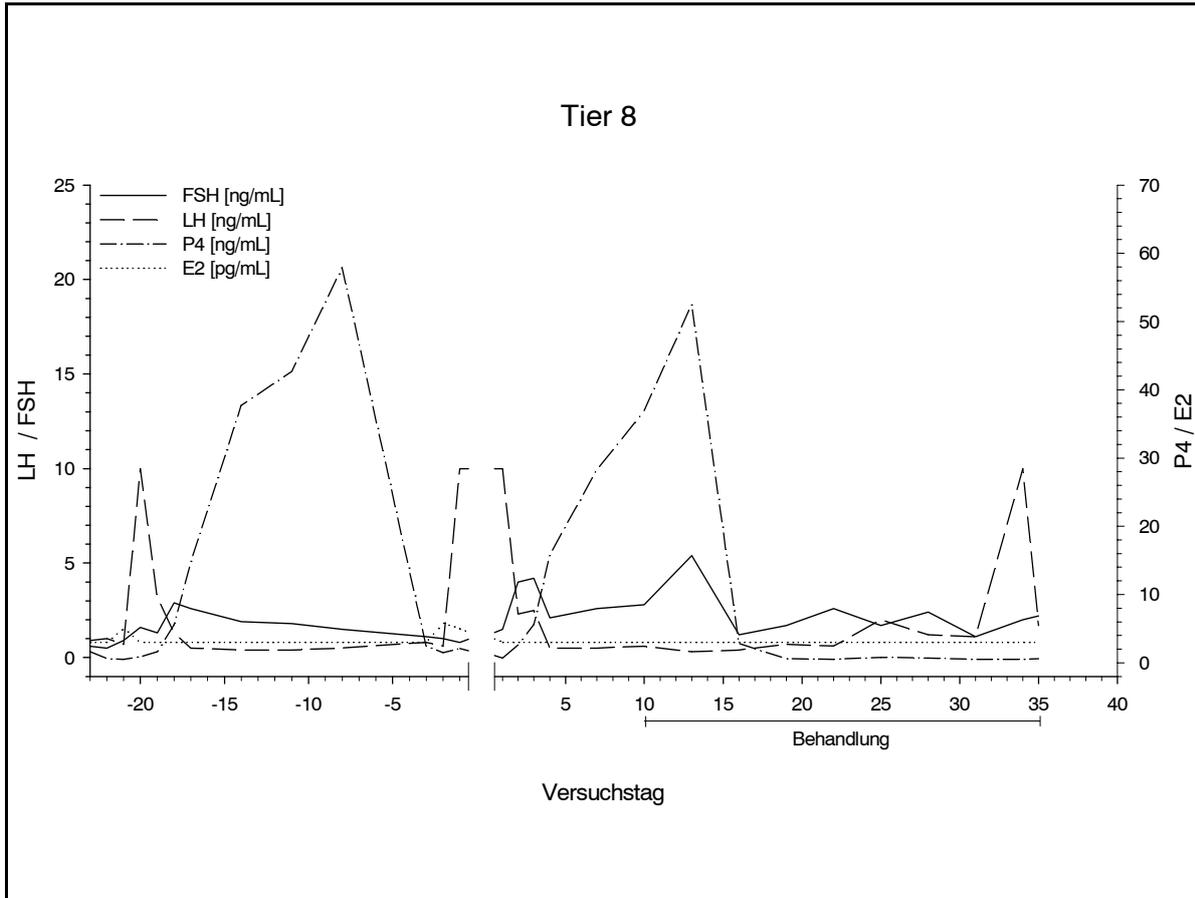


Abbildung 20: Hormonkonzentrationen von Tier 8 (0,02 mg/kg/Tag LNG) während des Hauptversuchs. FSH - Follikelstimulierendes Hormon, LH – Luteinisierendes Hormon, P4 - Progesteron, E2 – 17- β -Estradiol, pg – Picogramm, ng - Nanogramm, mL - Milliliter

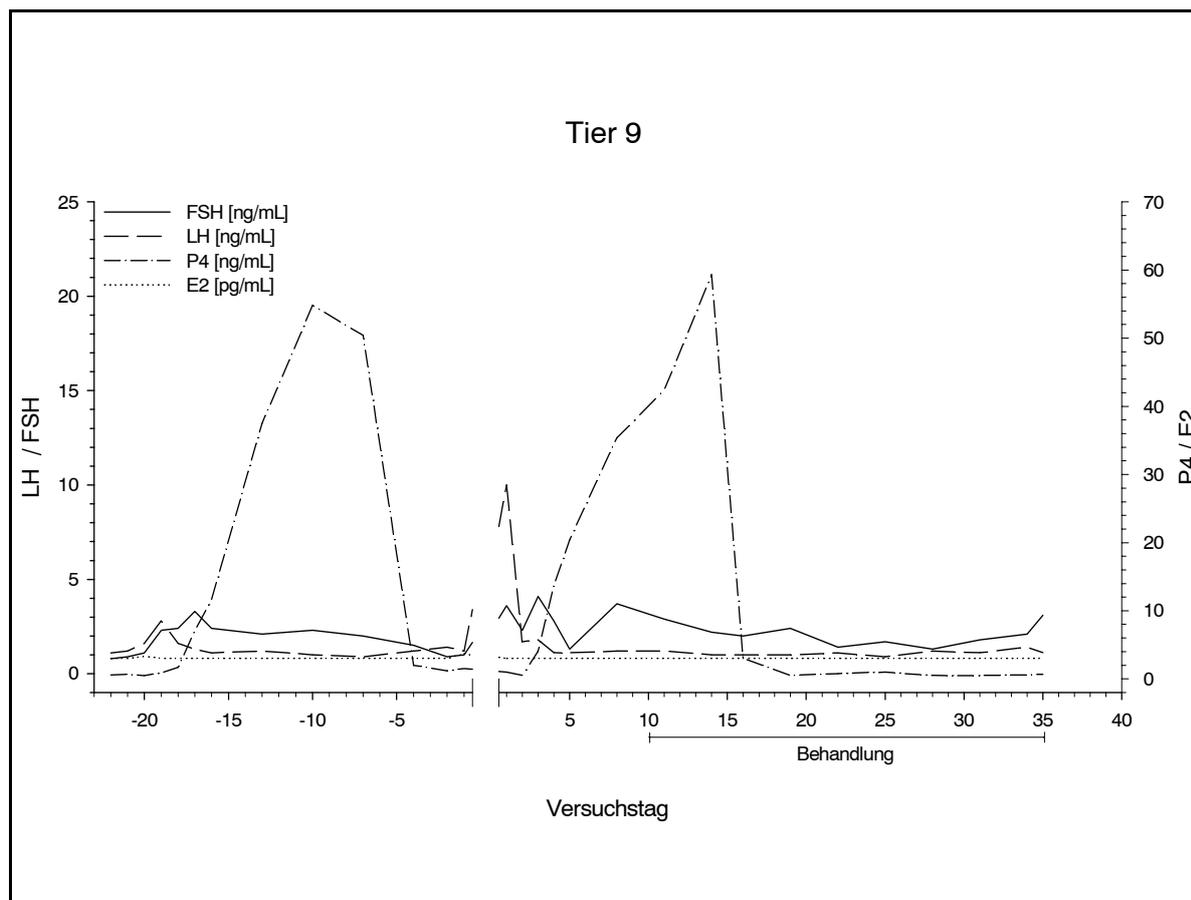


Abbildung 21: Hormonkonzentrationen von Tier 9 (0,02 mg/kg/Tag LNG) während des Hauptversuchs. FSH - Follikelstimulierendes Hormon, LH - Luteinisierendes Hormon, P4 - Progesteron, E2 - 17- β -Estradiol, pg - Picogramm, ng - Nanogramm, mL - Milliliter

Hohe Dosisgruppe (0,1 mg/kg/Tag LNG)

Nachfolgend sind in den Abbildungen 22-24 die Verlaufskurven der Hormonkonzentrationen der hohen Dosisgruppe dargestellt.

Die FSH-Konzentrationen in der hohen Dosisgruppe zeigten eine gleichmäßige, wellenförmige und bis Tag 10 eine zyklusabhängige Dynamik. Maximale Werte wurden an den Tagen –18 und 2 bis 4 gemessen. Ab Tag 10 waren bei keinem Tier eindeutig zyklusabhängige Konzentrationsunterschiede zu beobachten.

Die LH-Konzentrationen erreichten ihre Maximalwerte an den Tagen –21 bis –20 und 1. Während des Behandlungszeitraums wurde nur bei Tier 10 an Tag 25 ein leicht erhöhter Wert gemessen.

Die Progesteronkonzentrationen stiegen in den Zeiträumen von Tag –10 bis –7 und Tag 10 bis 14. In der weiteren Behandlungszeit war bei keinem Tier dieser Gruppe ein Anstieg der P4-Konzentration zu erkennen.

Die E2-Konzentrationen zeigten sehr uneinheitliche Werte im Zeitraum von Tag –21 bis Tag –4. So wurden zwischen den Tagen –21 bis –20 und –8 bis 1 z. T. erhöhte Werte gemessen. Während der Behandlung mit LNG traten bei keinem Tier der hohen Dosisgruppe E2-Konzentrationen auf, die oberhalb der unteren Nachweisgrenze lagen.

Bei allen Tieren der hohen Dosisgruppe zeigten die Hormonkonzentrationen einen physiologischen Zyklus vor der Behandlung. Bei der Behandlung mit LNG konnte bei keinem der Tiere in der hohen Dosisgruppe das typisch zyklusabhängige Hormonprofil beobachtet werden.

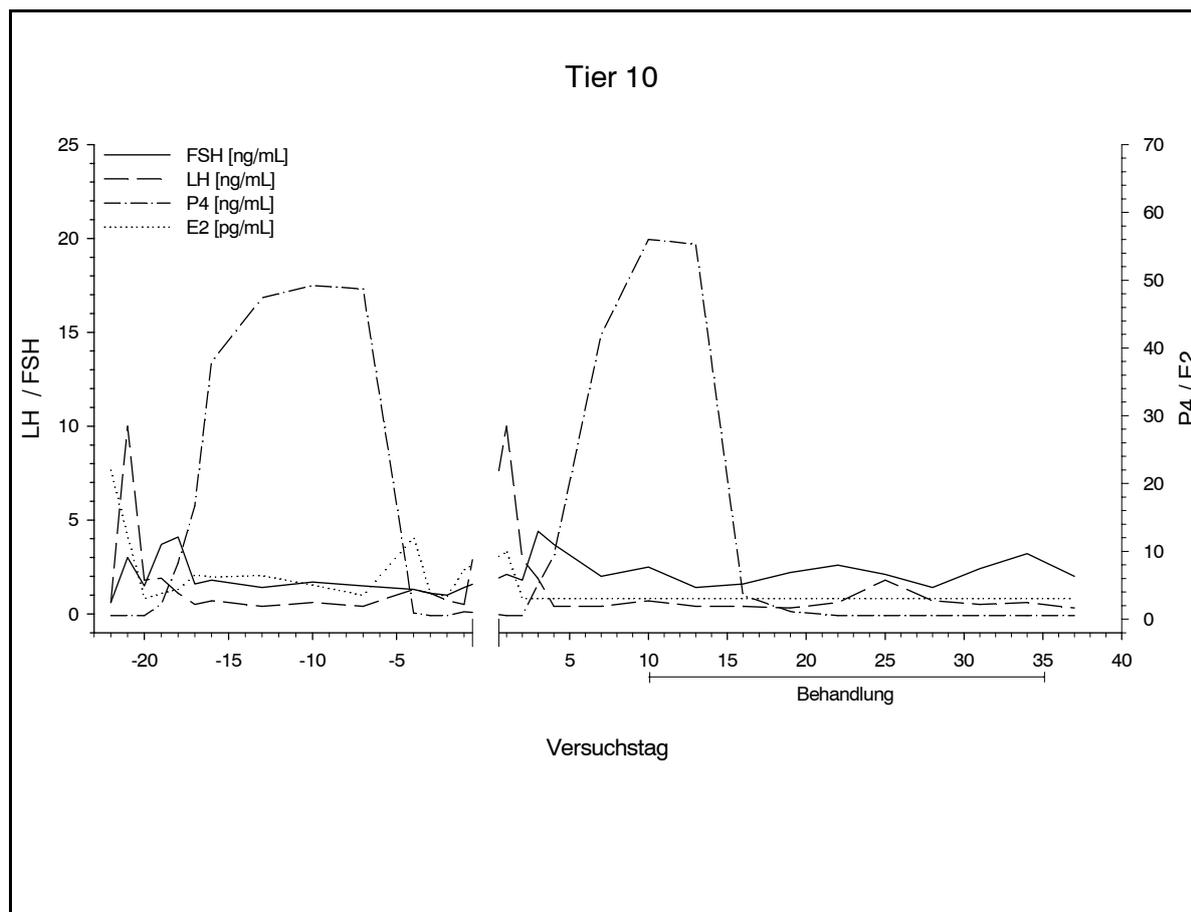


Abbildung 22: Hormonkonzentrationen von Tier 10 (0,1 mg/kg/Tag LNG) während des Hauptversuchs. FSH - Follikelstimulierendes Hormon, LH – Luteinisierendes Hormon, P4 - Progesteron, E2 – 17- β -Estradiol, pg – Picogramm, ng - Nanogramm, mL – Milliliter

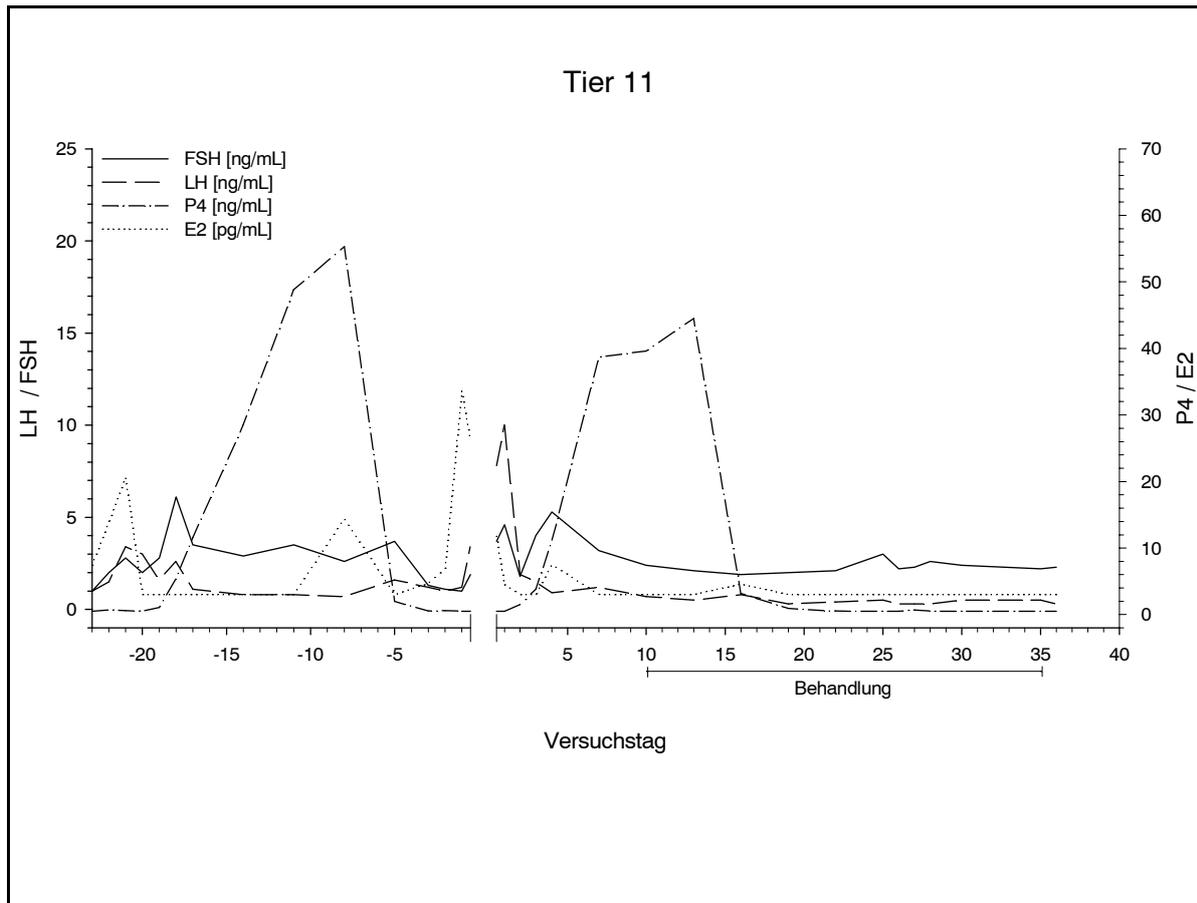


Abbildung 23: Hormonkonzentrationen von Tier 11 (0,1 mg/kg/Tag LNG) während des Hauptversuchs. FSH - Follikelstimulierendes Hormon, LH – Luteinisierendes Hormon, P4 - Progesteron, E2 – 17-β-Estradiol, pg – Picogramm, ng - Nanogramm, mL - Milliliter

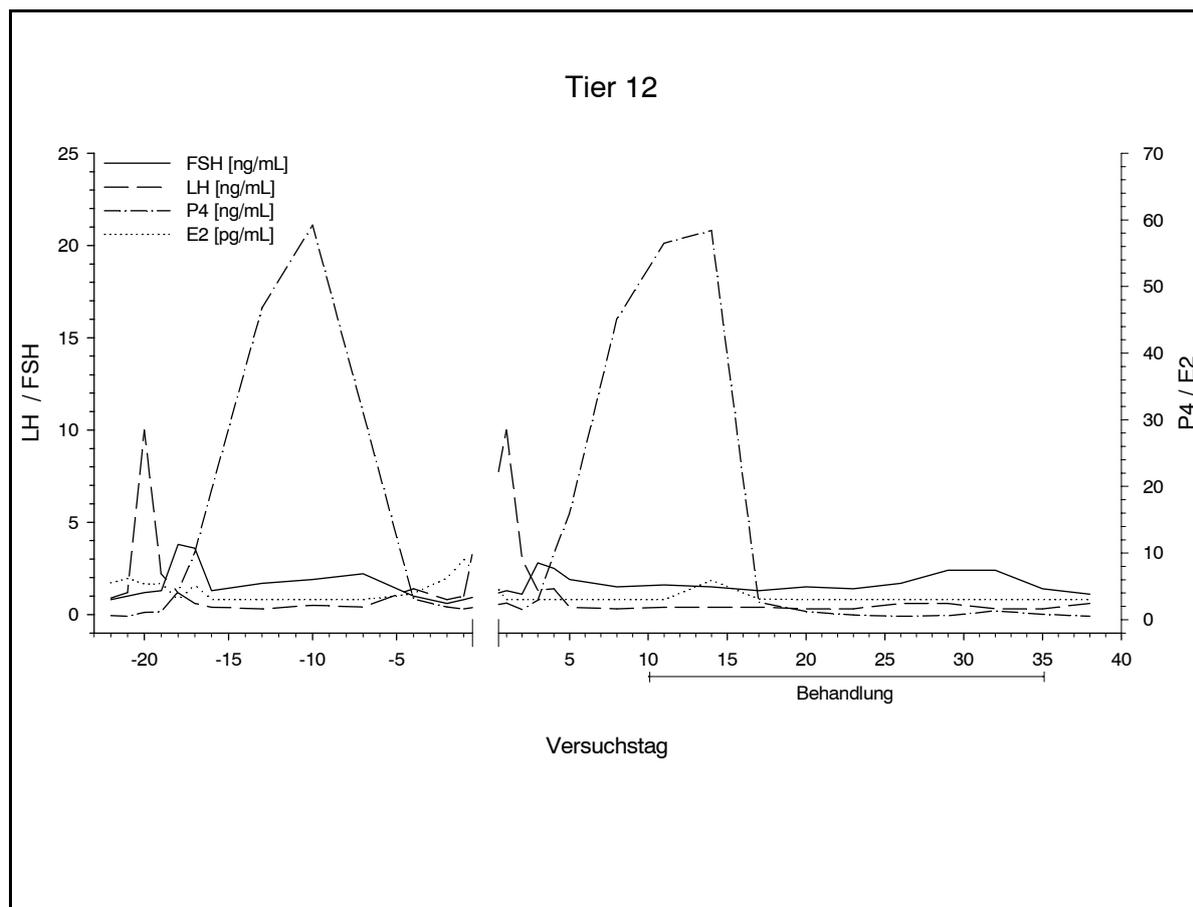


Abbildung 24: Hormonkonzentrationen von Tier 12 (0,1 mg/kg/Tag LNG) während des Hauptversuchs. FSH - Follikelstimulierendes Hormon, LH – Luteinisierendes Hormon, P4 - Progesteron, E2 – 17- β -Estradiol, pg – Picogramm, ng - Nanogramm, mL - Milliliter

4.2.7 Levonorgestrel-Bioanalytik

Die Wirkstoffspiegel von LNG im Plasma der Minischweine (Abbildung 25) wurden mindestens jeden 3. Tag jeweils 24 Stunden nach der Applikation gemessen. Die Konzentrationen bei den Tiere der niedrigen Dosisgruppe (Tier 4 bis Tier 6; 0,002 mg/kg/Tag LNG) waren so gering, dass sie mit Ausnahme von 2 Messwerten unterhalb der Nachweisgrenze (125 pg/mL) dieser Bestimmungsmethode lagen. Es wurde daher bei der Levonorgestrel-Bioanalytik von der Darstellung der Messwerte dieser Dosisgruppe abgesehen.

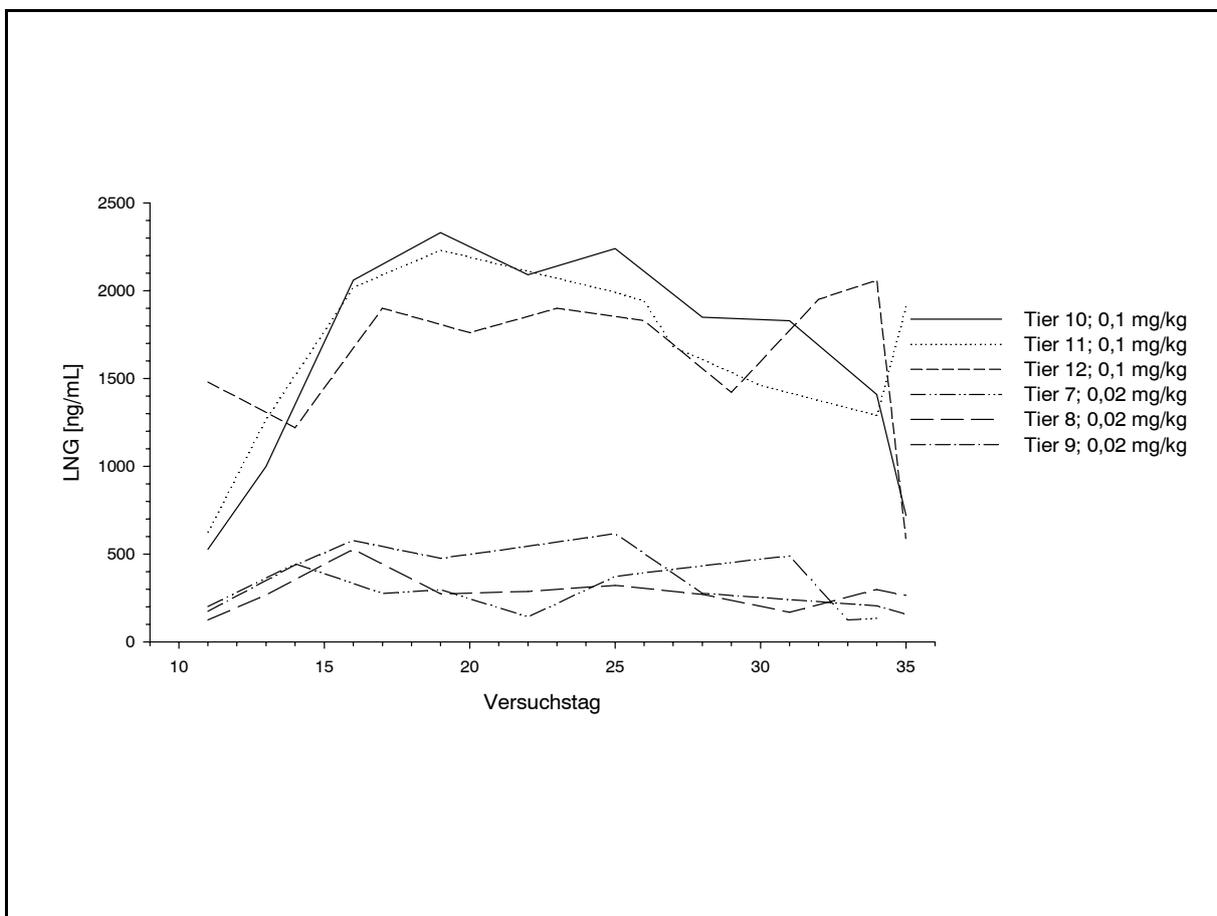


Abbildung 25: LNG-Konzentrationen im Plasma von Göttinger Minischweinen während des Behandlungszeitraumes ca. 24 h nach der Applikation von LNG. LNG - Levonorgestrel, ng – Nanogramm, mg – Milligramm, kg - Kilogramm, mL - Milliliter.

Am ersten und letzten Tag der LNG-Applikation wurde jeweils ein Profil der Wirkstoffspiegel 0, 4, 8, 12 und 24 Stunden nach der Applikation erstellt (siehe Abbildung 26 und 27). Messungen unterhalb der Nachweisgrenze von 125 pg/mL wurden in den Abbildungen als 125 pg/mL dargestellt. Die Konzentrationen in der niedrigen Dosisgruppe (Tier 4, 5, 6) waren so gering, dass sie ebenfalls unterhalb der Nachweisgrenze lagen und deshalb nicht abgebildet wurden.

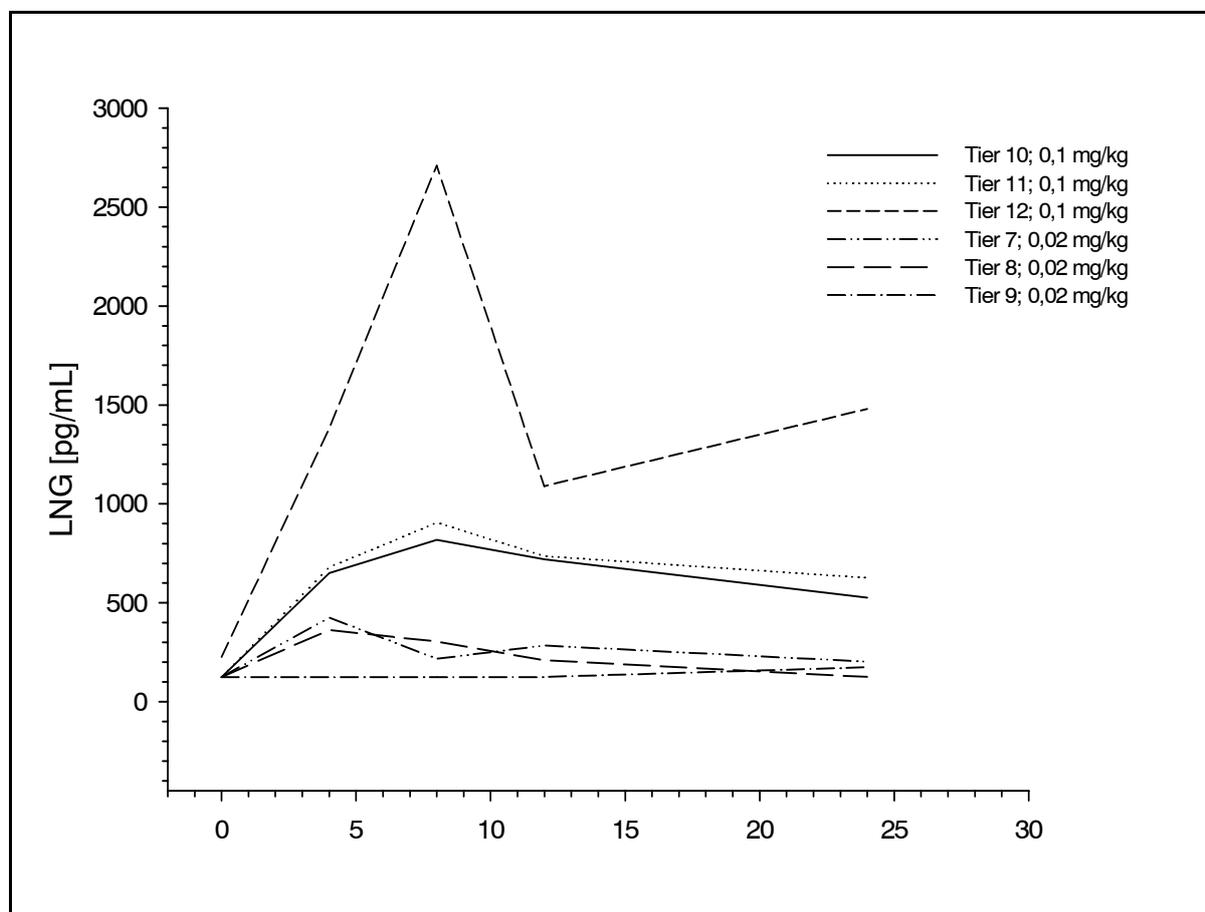


Abbildung 26: Wirkstoffspiegelprofil 0-24 h nach der ersten intramuskulären Applikation von LNG. LNG – Levonorgestrel, h – Stunde, pg – Picogramm, mg – Milligramm, kg - Kilogramm

Nach der ersten intramuskulären Applikation erreichten die gemessenen LNG-Konzentrationen in der hohen Dosis nach 8 Stunden die maximale Plasmakonzentration, die zwischen 818 pg/mL und 2710 pg/mL lag. Tier 12 zeigte ca. 3-fach erhöhte Messwerte gegenüber den übrigen Tieren. In der mittleren Dosis wurden maximale Plasmakonzentrationen bei Tier 7 und 8 nach 4 Stunden, bei Tier 9 erst nach 24 Stunden nach der Applikation gemessen. Bei Tier 9 war dieser Wert zugleich das erste Messergebnis, das oberhalb der Nachweisgrenze lag. Die LNG-Konzentrationen in der mittleren Dosis lagen zwischen 174 pg/mL und 425 pg/mL. Die AUC („area under the curve“ - Fläche unter der Kurve) im Zeitraum 0-24 Stunden nach der Applikation betrug für die hohe Dosis 21,5 ng/mL*h, für die mittlere Dosisgruppe 3,36 ng/mL*h.

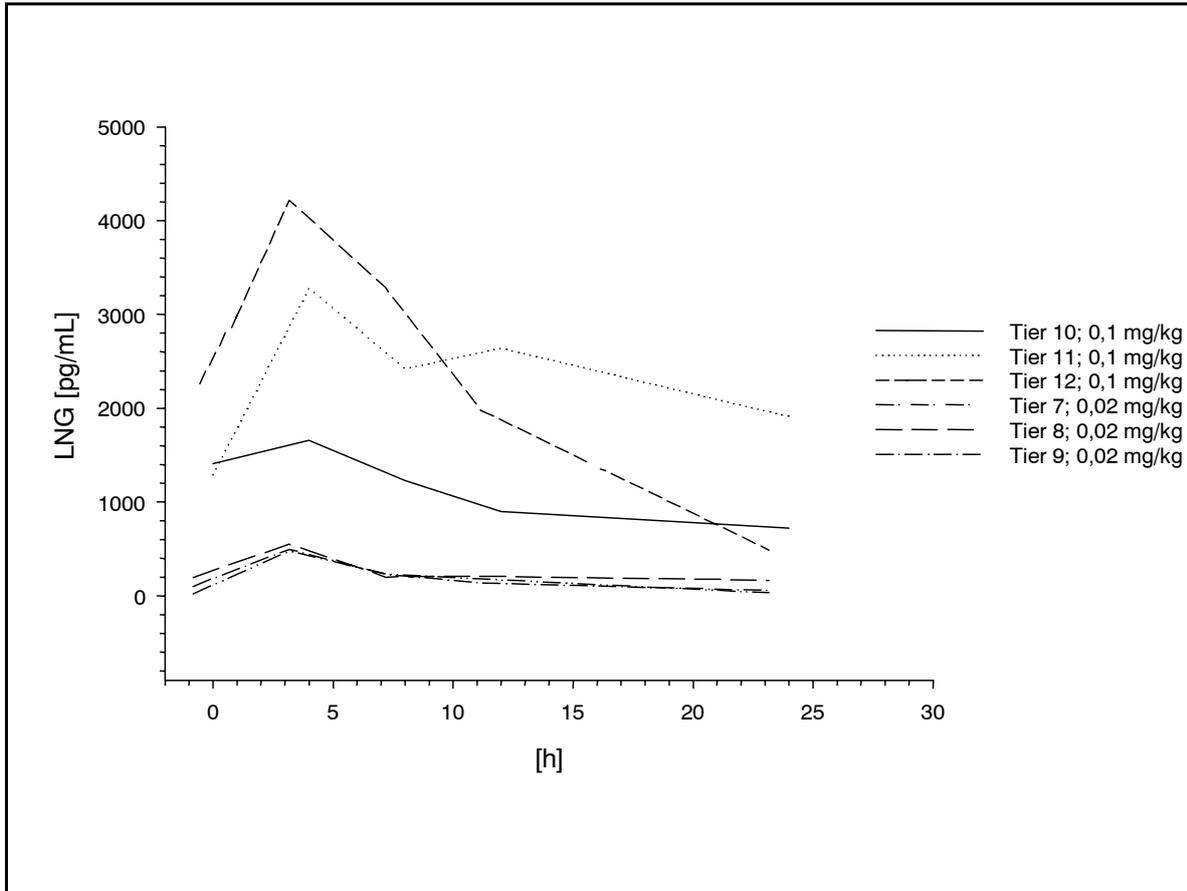


Abbildung 27: Wirkstoffspiegelprofil 0-24 h nach der 24. intramuskulären Applikation von LNG. LNG – Levonorgestrel, h – Stunde, pg – Picogramm, mg – Milligramm, kg - Kilogramm.

An Tag 34 des Hauptversuchs (24. Behandlungstag) erreichte die gemessene LNG-Konzentration in der mittleren und hohen Dosis 4 h nach der Applikation die maximal gemessene Konzentration. Diese lag in der hohen Dosisgruppe zwischen 1660 pg/mL und 4320 pg/mL und in der mittleren Dosisgruppe zwischen 580 pg/mL und 655 pg/mL. Die mittlere AUC betrug in der hohen Dosisgruppe (0,1 mg/kg/Tag LNG) 45,5 ng/mL*h und in der mittleren Dosisgruppe (0,02 mg/kg/Tag LNG) 7,30 ng/mL*h. In den Dosisgruppen 0,02 mg/kg/Tag und 0,1 mg/kg/Tag stieg die Exposition der Tiere zwischen der ersten und der 24. Applikation im Mittel um das 2-fache an. Die errechneten pharmakokinetischen Parameter sind in Tabelle 22 aufgeführt.

Tabelle 22: Pharmakokinetische Parameter nach intramuskulärer Gabe von 0,02 mg/kg/Tag und 0,1 mg/kg/Tag LNG beim Göttinger Minischwein über 24 Tage

Dosis LNG [mg/kg/Tag]	Versuchs- tag	Tier	C _{max} [pg/mL]	t _{max} [h]	AUC (0-24h) [ng/mL*h]	Akku- mulation
0,02	10	T 7	425	4	5,98	
		T 8	363	4	3,07	
		T 9	174	24	1,044	
		MW STAB	321 131	10,7 11,5	3,36 2,48	
	34	T 7	580	4	6,57	1,10
		T 8	655	4	8,43	2,75
		T 9	598	4	6,90	6,61
		MW STAB	611 39,2	4 0	7,30 0,99	3,48 2,83
0,1	10	T 10	818	8	14,7	
		T 11	905	8	16,0	
		T 12	2710	8	33,9	
		MW STAB	1478 1068	8 0	21,5 10,7	
	34	T 10	1660	4	25,8	1,75
		T 11	3280	4	57,6	3,61
		T 12	4320	4	53,0	1,56
		MW STAB	3087 1340	4 0	45,5 17,2	2,31 1,13

LNG – Levonorgestrel, C_{max} – maximale Konzentration, t_{max} – Zeitpunkt, an dem die maximale Konzentration gemessen wurde, AUC – Fläche unter der Kurve, MW – Mittelwert, STAB – Standardabweichung, T7-T12 = Tier 7-12, pg – Picogramm, ng – Nanogramm, mg – Milligramm, kg – Kilogramm, mL – Milliliter, h - Stunde

4.2.8 Gerinnungsphysiologische, hämatologische und klinisch-chemische Untersuchungen

Gerinnungsphysiologische Parameter

Es wurden keine Veränderungen der physiologischen Werte beobachtet. Die Einzelwerte sind in Tabelle 32 im Anhang aufgeführt.

Hämatologie

Es wurden keine Veränderungen der physiologischen Werte beobachtet. Die Einzelwerte sind in Tabelle 33 im Anhang aufgeführt.

Weisses Blutbild

Es wurden keine Veränderungen der physiologischen Werte beobachtet. Die Einzelwerte sind in Tabelle 34 im Anhang aufgeführt.

Klinisch-chemische Untersuchungen

Es wurden keine Veränderungen der physiologischen Werte beobachtet. Die Einzelwerte sind in Tabelle 35 im Anhang aufgeführt.

Serumproteinelektrophorese

Es wurden keine Abweichungen der physiologischen Werte beobachtet [Kaneko, J. J. *et al.* (1997)]. Die Einzelwerte sind in Tabelle 36 im Anhang dargestellt.

4.2.9 Futterverzehr/Körpergewichte

Von Versuchstag 1 bis 35 wurde der Futterverzehr der Minischweine bestimmt. Eine Beeinträchtigung der Futteraufnahme war nicht zu beobachten. Die Einzeldaten sind in Tabelle 43 im Anhang dargestellt.

Die Körpergewichte der Minischweine zeigten unabhängig von der Dosis Schwankungen, die von geringen Abnahmen bis Zunahmen von maximal 2 kg (Tier 3) reichten. Wegen des zeitlich versetzten Versuchsbeginns und durch die Tierausswahl jedes Blockes (1 Kontrolltier, 3 Dostiere) variierte das Alter innerhalb der Kontrollgruppe deutlich mehr als in den Dosisgruppen. Eine Verminderung der limitierten Futteraufnahme trat nicht auf. Die Einzelwerte sind in Tabelle 44 im Anhang aufgeführt.

4.2.10 Postmortale Untersuchungen

Makroskopische Befunde

Bei der Sektion wurden Veränderungen der Organe in bezug auf Farbe, Umfang und Gewicht sowie auf makroskopisch auffällige Besonderheiten beurteilt. Organe mit makroskopischen Befunden wurden aufgearbeitet und histologisch beurteilt. In der histologischen Untersuchung konnten makroskopischen Befunden teilweise histologische Korrele zugeordnet werden (siehe Tabelle 23).

Tabelle 23: Korrelation makroskopischer und histologischer Befunde

Dosis / Tier		makroskopisch	histologisch
Vehikelkontrolle	T1	Thymus: beidseitig fokal gerötet Ln. iliacus: rechts gerötet	Thymus: beidseitig, Blutresorption Ln. iliacus: rechts, Ölresorption, Blutresorption
	T2	Thymus: beidseitig fokal gerötet	Thymus: Blutresorption
	T3	Ln. iliacus: beidseitig vergrößert	Ln. iliacus: Ölresorption, Blutresorption
0,002 mg/kg/Tag LNG	T4	Lunge: beidseitig geschwollen, links gerötet	Lunge: nicht untersucht
	T5	Ln. iliacus: beidseitig gerötet	Ln. iliacus: Ölresorption, Blutresorption
	T6	Ln. iliacus: beidseitig vergrößert, links gerötet	Ln. iliacus: Ölresorption, Blutresorption
0,02 mg/kg/Tag LNG	T7	Ln. iliacus: beidseitig gerötet Ovar: verkleinert	Ln. iliacus: Ölresorption, Blutresorption Ovar: keine CL
	T8	Ln. iliacus: beidseitig vergrößert, gerötet Ovar: rechts hämorrhagische Zysten mit 0,4 cm Durchmesser; verkleinert	Ln. iliacus: Ölresorption, Blutresorption Ovar: Blutresorption, keine CL
	T9	Uterus: hämorrhagische Zyste mit einem Durchmesser von 0,5 cm im ligamentum latum uteri dexter Ovar: verkleinert	Uterus: periovariell Bindegewebe, Zyste Ovar: keine CL
0,1 mg/kg/Tag LNG	T10	Ln. iliacus: beidseitig gerötet Ovar: verkleinert	Ln. iliacus: Ölresorption, Blutresorption Ovar: keine CL
	T11	Harnblase: Mucosa am Hals gerötet Ln. iliacus: beidseitig gerötet Applikationsstellen: fokal gerötet Ovar: verkleinert	Harnblase: nicht untersucht Ln. iliacus: Ölresorption, Blutresorption Applikationsstellen: Blutresorption Ovar: keine CL
	T12	Uterus: Zysten mit einem Durchmesser von 1 cm in den ligamentia lati uteri Thymus: beidseitig fokal gerötet Ln. iliacus: beidseitig gerötet Ovar: verkleinert	Uterus: nicht untersucht Thymus: Blutresorption Ln. iliacus: Ölresorption, Blutresorption Ovar: keine CL

LNG – Levonorgestrel, CL – Corpus luteum, Ln – Lymphonodus, mg – Milligramm, kg – Kilogramm, cm – Zentimeter, T1-T12 = Tier 1 – Tier 12

Ergebnisse

Auffällige Größenunterschiede der Ovarien zeigten sich konsistent bei allen Tieren der Kontroll- und niedrigen Dosisgruppe im Vergleich zu denen der mittleren und hohen Dosisgruppe. Dabei war deutlich zu erkennen, dass sich bei den Tieren der Kontroll- bzw. niedrigen Dosisgruppe CLs gebildet hatten, während die Ovarien der mittleren und hohen Dosisgruppe nur einige ältere Corpora albicantia aufwiesen. Die Follikel an den Ovarien der mittleren und hohen Dosisgruppe wiesen einen größeren Durchmesser als die der Kontroll- und niedrigen Dosisgruppe auf. Eine Gegenüberstellung der Ovarien von 2 Tieren der entsprechenden Gruppen in Abbildung 28 verdeutlicht dies.

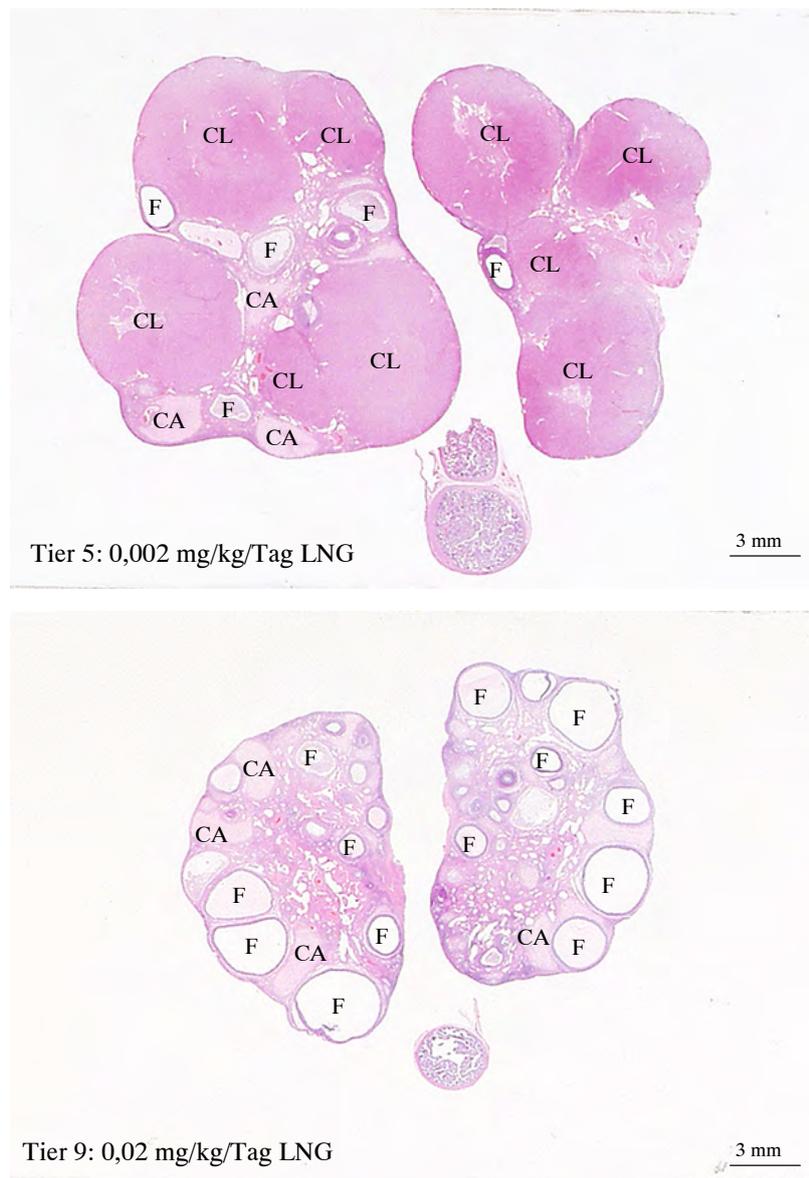


Abbildung 28: Mikroskopische Ovarienbefunde (Hämatoxylin-Eosin-Färbung) in der Übersichtsvergrößerung am Beispiel der niedrigen (0,002 mg/kg/Tag) und mittleren (0,02 mg/kg/Tag) Dosisgruppe: LNG – Levonorgestrel, CL - Corpus luteum, CA - Corpus albicans, F - Follikel.

Das Auftreten von CLs spiegelte sich auch deutlich in den Ovargewichten wieder. In der Kontroll- und niedrigen Dosisgruppe lagen die Gewichte der Ovarien mit 2,42 g bis 4,51 g ca. doppelt bis 3-fach so hoch wie die der mittleren und hohen Dosisgruppe mit 0,85 g bis 2,36 g. Dabei zeigten die Kontrollgruppe und die hohe Dosisgruppe eine sehr hohe Variabilität. Die absoluten und relativen Einzelwerte sind in Tabelle 24 dargestellt. Die Uterusgewichte in der Kontroll- und niedrigen Dosisgruppe lagen zwischen 172,8 g und 259,8 g und damit ca. um 2/3 höher als in der mittleren und hohen Dosisgruppe mit 131,9 g bis 165,7 g (vergleiche dazu Tabelle 24).

Tabelle 24: Organgewichte sowie Mittelwerte und Standardabweichungen von Ovarien und Uterus

		Kontrolle			0,002 mg/kg/Tag LNG			0,02 mg/kg/Tag LNG			0,1 mg/kg/Tag LNG		
Tier Nr.		T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
Ovar	[g]	2,42	4,51	2,98	3,22	3,16	3,36	1,55	1,53	1,29	1,72	0,85	2,36
	[%]	4,27	7,47	5,44	5,32	5,08	5,35	2,51	2,49	2,11	3,23	1,38	3,87
MW		3,30			3,25			1,46			1,64		
STAB		1,08			0,10			0,14			0,76		
Uterus	[g]	172,8	204,0	249,7	248,1	259,8	195,2	131,9	137,2	164,1	165,7	145,4	165,7
	[%]	305,2	338,0	455,7	410,2	417,9	311,0	213,9	223,6	267,8	310,9	235,2	271,6
MW		208,83			234,37			144,40			158,93		
STAB		79,14			59,62			28,73			37,86		

LNG - Levonorgestrel, T1 - T12 = Tier 1 - 12, g - Gramm, mg – Milligramm, kg - Kilogramm, % - Prozent, MW - Mittelwerte, STAB - Standardabweichung

Mikroskopische Befunde

Ovar

Bis zu einer Größe von 3 mm war in der Kontrollgruppe und hohen Dosisgruppe (0,1 mg/kg/Tag LNG) eine ähnliche Anzahl von Follikeln zu beobachten (siehe Tabelle 25). Nur in der mittleren Dosisgruppe (0,02 mg/kg/Tag LNG) traten Follikel mit einem Durchmesser von mehr als 3 mm auf. In der niedrigen Dosisgruppe (0,002 mg/kg/Tag LNG) wurden am wenigsten Follikel von 1-3 mm Durchmesser beobachtet.

Tabelle 25: Histologische Auswertung der Follikel, CLs und CAs im Ovar der Minischweine nach 24-tägiger intramuskulärer Behandlung mit LNG

		Kontrolle			0,002 mg/kg/Tag LNG			0,02 mg/kg/Tag LNG			0,1 mg/kg/Tag LNG			
Tier		T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	
ANZAHL	Follikel (antral)													
	< 1 mm	2	4	4		2		6	1	3	2	2	2	
	1-2 mm	4	8	18	4	5	9	9	2	7	16	8	10	
	2-3 mm	3	7	4	5		6	3	4	6	8	1	6	
	> 3 mm							2	3	1				
	CL Stadium													
	früh		6											
	mittel	5		7	8		6							
	spät					10								
	CA	3	7	7	11	5	6	12	9	8	2	10	7	

LNG – Levonorgestrel, T1-T12 = Tier 1-12, CL – Corpus luteum: früh - Corpus hämorrhagicum/rubrum, mittel - Corpus luteum (in Blüte), spät – Regressionskörper, CA - Corpus albicans/Residualkörper, mm – Millimeter, mg – Milligramm, kg - Kilogramm

Corpora lutea traten nur bei den Tieren der Kontrollgruppe und niedrigen Dosisgruppe auf (siehe Tabelle 25). Dabei variierte die CL Entwicklung innerhalb der Kontrollgruppe vom frühen bis mittleren Stadium und in der niedrigen Dosis vom mittleren bis späten Stadium.

Die Corpora albicantia zeigten zwei Zonen: die Außenzone enthielt radiär angeordnete Bindegewebsstränge mit nach innen verlaufenden Blutgefäßen, die von Fibrozyten und Fibroblasten umgeben waren. In der Innenzone traten Gefäße ohne glatte Muskelzellen auf. Die Verteilung innerhalb der Schnittebene ließ keinen Rückschluss auf die Dosisgruppen zu. In der Kontrollgruppe wurden deutlich weniger Corpora albicantia (13) als in der niedrigen (22), mittleren (29) und hohen Dosisgruppe (19) beobachtet.

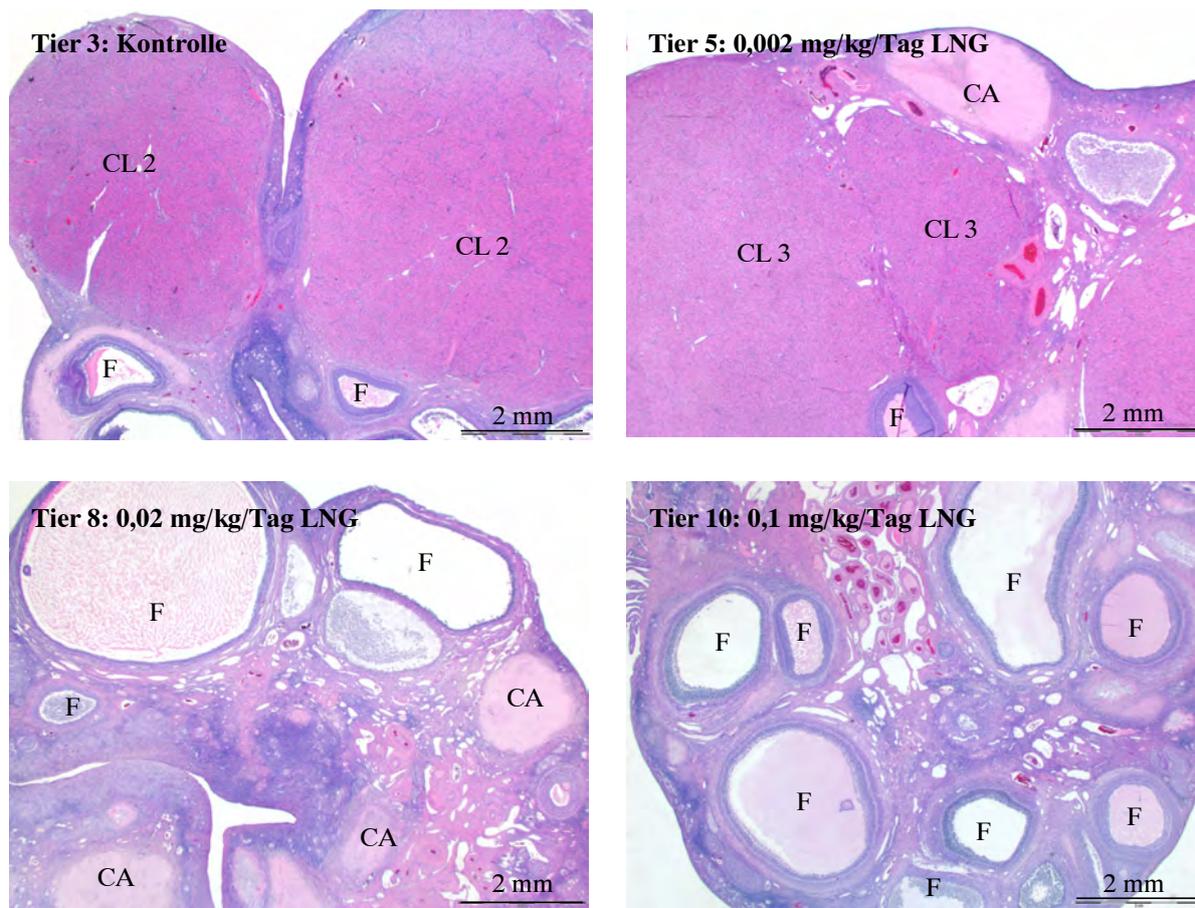


Abbildung 29: Histologie (Hämatoxylin-Eosin-Färbung) der Ovarien der Kontroll- und Dosisgruppe nach 24-tägiger intramuskulärer Behandlung mit Levonorgestrel. LNG - Levonorgestrel, F - Follikel, CA - Corpus albicans, CL 2 - Corpus hämorrhagicum/rubrum, CL 3 - Regressionskörper, mm – Millimeter, mg - Milligramm, kg - Kilogramm

Uterus

Die Messungen der endometrialen Epithelhöhe wurden in den Uterushörnern und in der Cervix uteri durchgeführt. In den Uterushörnern war in der mittleren und hohen Dosisgruppe eine tendenzielle Zunahme der Endometriumsepithelhöhe mit steigender Dosis zu erkennen. Im Cervixepithel war keine Zunahme der Epithelhöhe zwischen Kontrollgruppe und den Dosisgruppen zu verzeichnen. Die morphometrischen und histologischen Ergebnisse der Auswertung des Uterus sind in Tabelle 46 im Anhang dargestellt. In Abbildung 30 sind die Messwerte der Uterushörner graphisch dargestellt.

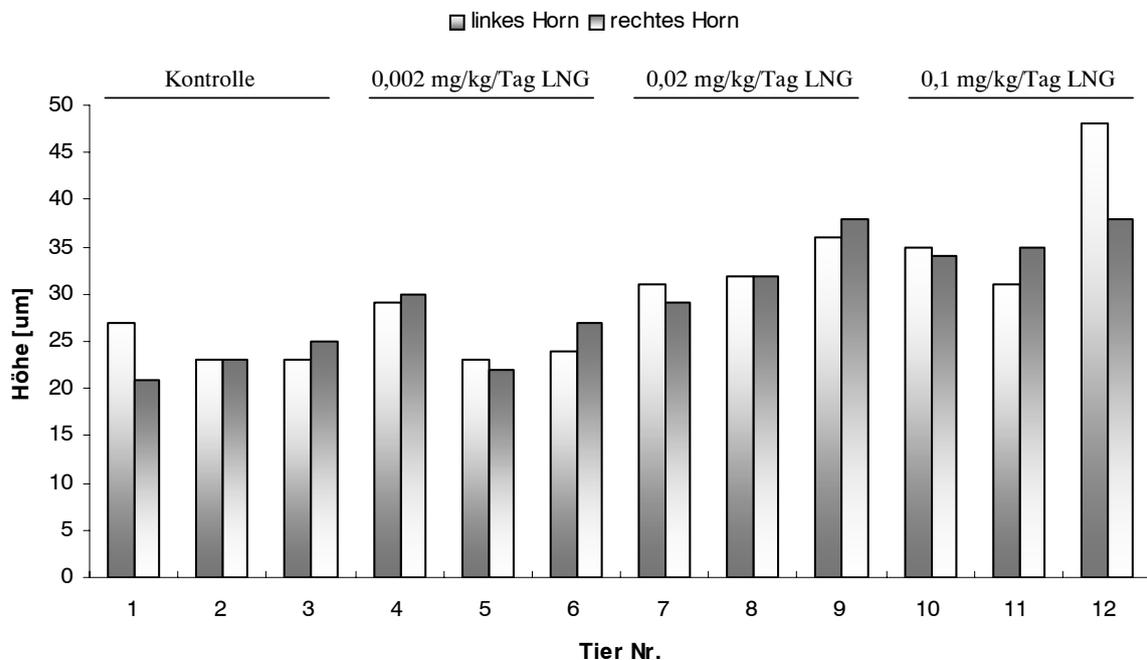


Abbildung 30: Endometriumsepithelhöhe am Uterushorn, Messungen nach 24-tägiger intramuskulärer LNG – Behandlung. LNG – Levonorgestrel, µm - Micrometer, mg - Milligramm, kg - Kilogramm

In Abbildung 31 ist ein Uterushorn eines Tieres jeder Gruppe dargestellt. Bei der Einzelauswertung wurde insbesondere auf dosisabhängige Effekte am Endometrium geachtet. Dabei zeigte sich, dass bei einer Dosis von 0,1 mg/kg/Tag LNG sowohl im linken als auch im rechten Uterushorn neben der Zunahme der Endometriumshöhe auch die Anzahl der Kernreihen auf 2-3 im Vergleich zu 1-2 wie in der Kontrollgruppe, 0,002 mg/kg/Tag und 0,02 mg/kg/Tag LNG-Dosisgruppe zunahm. Die Lage der Kerne veränderte sich von der Kontrolle zu der hohen Dosisgruppe von basal nach apikal. Zusätzlich war eine Zunahme der Sekretvakuolen von gering bis mittelgradig bei aufsteigender Dosis zu beobachten. Das Auftreten von Stiftchenzellen wurde bei zwei Tieren der mittleren Dosis (Tier 8 und 9) und zwei Tieren der hohen Dosis (Tier 10 und 12) als mittelgradig erhöht bewertet. Ein vermehrtes Auftreten von Leukozyten war jeweils bei einem Tier der niedrigen Dosis (Tier 6), der mittleren Dosis (Tier 7) und der hohen Dosis (Tier 10) zu beobachten. Deutliche Veränderungen wurden in der Endometriumstruktur beobachtet. Während sich in der Kontrollgruppe und niedrigen Dosisgruppe das Epithel bei allen Tieren einreihig, glatt und regelmäßig darstellte, war in der mittleren und hohen Dosis ein hochprismatisches, teilweise mehrreihiges, sehr unregelmäßiges Epithel zu erkennen, das eine deutliche Sekretion zeigte.

An den Uterindrüsen in der Lamina propria wurde keine Zunahme der Epithelschichten, keine Ödematisierung und keine vermehrte Sekretbildung zwischen der Kontrollgruppe und den Dosisgruppen beobachtet.

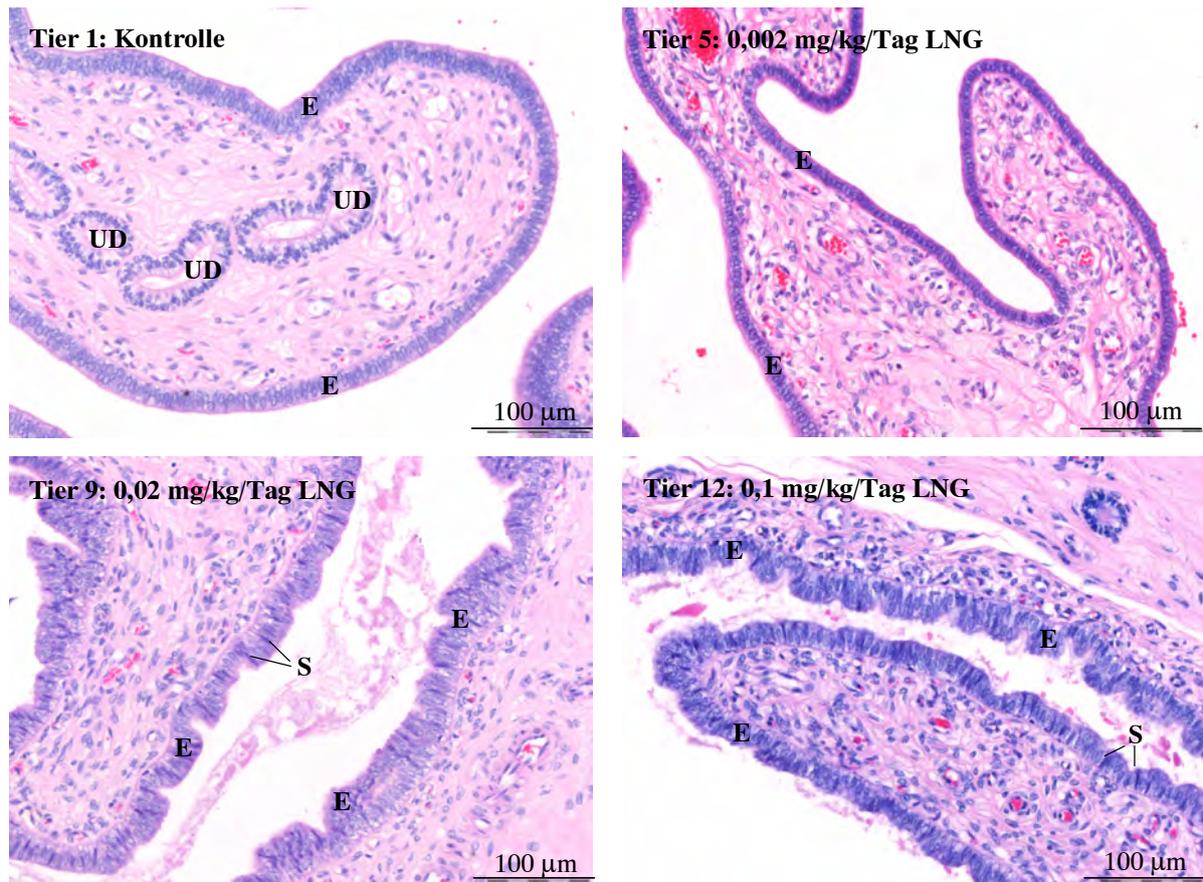


Abbildung 31: Histologie eines Uterushornes der Kontrollgruppe und Dosisgruppen nach 24-tägiger intramuskulärer Gabe von Levonorgestrel (Hämatoxylin-Eosin-Färbung), Tier 9 und 12 zeigten neben der deutlichen Aktivität mit Sekretion des Endometriums das Auftreten von Stiftchenzellen und eine raue Epitheloberfläche. LNG - Levonorgestrel, UD - Uterindrüsen, S - Stiftchenzellen, E - Endometrium, μm – Micrometer, mg - Milligramm, kg – Kilogramm.

Cervix

An der Cervix konnte keine Zunahme der Epithelhöhe bei der hohen Dosis im Vergleich zur Kontrollgruppe gemessen werden. Das Schleimhautepithel in der Kontrollgruppe war überwiegend einschichtig und hochprismatisch, die Zellkerne lagen basal. In der mittleren Dosis wurde 3-4 schichtiges Epithel beobachtet, die Zellkerne verlagerten sich ins Zellzentrum und die Zellen wurden isoprismatisch. In der hohen Dosis wurde 2-3 schichtiges, hochprismatisches Epithel beobachtet. Die Epitheloberfläche war glatt. Eine Ödematisierung der Lamina propria war nicht zu beobachten. Die Ergebnisse der histologischen Untersuchungen und der Messungen sind in Tabelle 46 im Anhang aufgeführt.

Vagina

Das Plattenepithel der Vagina war bei allen Tieren unverhornt. In der Kontrollgruppe und der niedrigen Dosisgruppe war das Epithel 3-4 schichtig, in der mittleren und hohen Dosis ging die Zahl der Schichten auf 2-3 zurück. Entsprechend verringerte sich die Epithelhöhe mit steigender Dosis, die von ca. 28-33 μm in der Kontrollgruppe auf ca. 19-22 μm in der hohen Dosisgruppe abnahm. In der hohen Dosis war eine leichte Erhöhung der Anzahl der Leukozyten zu beobachten. Die Ergebnisse der histologischen Untersuchungen und der Messungen sind in Tabelle 46 im Anhang aufgeführt.

Milchdrüse

Die Drüsenschläuche, Endstücke und Alveolen zeigten keine gruppeneinheitlichen, dosisabhängigen Veränderungen des Epithels. Das Epithel war 1-2 schichtig, isoprismatisch, und bei fast allen Tieren trat Sekret in den Alveolen oder Milchgängen auf. Dies war nicht bei den Tieren 10 und 11 der Fall, die zum Teil eine Atrophie der Epitheloberfläche der Alveolen oder vermehrt in Fettgewebe eingebettete Drüsen erkennen ließen. In den Dosisgruppen wurde bei fast allen Tieren ein vermehrtes Auftreten von Leukozyten beobachtet.

Hypophyse

Histologisch ließen sich basophile und azidophile Zellen unterscheiden, wobei die blaugefärbten basophilen Zellen größer als die azidophilen waren. Dosisabhängige Veränderungen zwischen den Hypophysen der Kontrollgruppe und den einzelnen Dosisgruppen waren nicht zu erkennen.

Nebenniere

Die Nebenniere zeigte eine deutliche Unterteilung in Rinden- und Markzone. In der Zona glomerulosa der Rinde waren bogenförmige Zellstränge mit azidophil gefärbten Zellen zu erkennen. Die Zona fasciculata bestand aus einem Netz von Zellsträngen, Bindegewebsfasern und Kapillaren. Das Zytoplasma der Zellen war leicht basophil gefärbt und wies z. T. Granula auf. In der Zona reticularis war ein verzweigtes Netz aus Drüsenzellen zu erkennen. Das Nebennierenmark war ein dichtes Geflecht von Zellen unterschiedlicher Größe und Kapillaren. Dosisabhängige Veränderungen zwischen den Nebennieren der Kontrollgruppe und den einzelnen Dosisgruppen waren nicht zu erkennen.

Niere

Die Niere zeigte eine deutliche Unterteilung in Rinden- und Markzone. In der Zona externa und interna der Rinde waren kortikale Glomerula, Markstreifen und verschiedene Abschnitte des Tubulussystems, wie proximale, distale Tubuli und Henle-Schleifen zu erkennen. Im Nierenmark zeigten sich gerade Sammelrohre und lange Henle-Schleifen. Dosisabhängige Veränderungen zwischen den Nieren der Kontrollgruppe und den einzelnen Dosisgruppen waren nicht zu erkennen.

Leber

Die Leber zeigte eine deutliche Läppchenstruktur. Von der äußeren Kapsel zogen Kollagenfasern im Leberparenchym, das eine große Menge an Granula aufwies, in Richtung Portalvene. Deutlich sichtbar waren auch die Lebertrias mit Arteria und Vena interlobularis und den Gallengängen zwischen den einzelnen Leberläppchen. Dosisabhängige Veränderungen zwischen den Lebern der Kontrollgruppe und den einzelnen Dosisgruppen waren nicht zu erkennen.

Skelettmuskel (Applikationsstelle)

Es wurden die Lokalisationen des Skelettmuskels untersucht, in welche die Applikation erfolgte. Dabei wurden in jeweils einem Tier der Kontrollgruppe und allen Tieren der mittleren und hohen Dosisgruppe gering- bis mittelgradiges Auftreten von Entzündungszellen sowie die Resorption von Blut und Fettvakuolen beobachtet. Einblutungen wurden bei Tieren aus jeder Gruppe beobachtet.

Thymus

Der Thymus zeigte eine deutliche Unterteilung in Rinde und Mark. Die Rindenbreite betrug dabei ca. 1/2 bis 1/3 des Markdurchmessers. Im Mark waren sternförmige Retikulumzellen sowie Hassall-Körperchen zu erkennen. Dosisabhängige Veränderungen zwischen den Organen der Kontrollgruppe und den einzelnen Dosisgruppen waren nicht zu erkennen.

Darmbeinlymphknoten

Der Lymphknoten zeigte eine undeutliche Trennung von Rinde und Mark, die Lymphfollikel waren diffus verteilt. Im Inneren des Lymphknotens war eine Resorption von Blut und Fettvakuolen deutlich zu erkennen. Dosisabhängige Veränderungen zwischen den Lymphknoten der Kontrollgruppe und den einzelnen Dosisgruppen waren nicht zu erkennen.

Femur/Sternum

Sowohl am Femur als auch am Sternum war eine regelmäßige Knorpel-/Knochengrenze sowie eine gleichmäßige Verknöcherung zu beobachten. Dosisabhängige Veränderungen zwischen den Knochenstrukturen der Kontrollgruppe und den einzelnen Dosisgruppen waren nicht zu erkennen.

Knochenmarkausstriche

Die 24-tägige intramuskuläre Behandlung mit LNG zeigte keinen Unterschied zwischen den Tieren der Kontrollgruppe und Dosisgruppen (Tabelle 47).

5 Diskussion

Für die Arzneimittelzulassung fordert die europäische Zulassungsbehörde für Arzneimittel (EMA) Angaben zur Qualität, Wirksamkeit und Sicherheit von neuen Substanzen. Die präklinische Sicherheit wird in Form toxikologischer Studien an einer Nager- und einer Nicht-Nagerspezies untersucht. Die Wirksamkeit neuer Substanzen wird in pharmakologischen Tiermodellen erfasst, bevor die erste Anwendung am Menschen erfolgt. Neben den bislang etablierten Spezies wurde als Vertreter einer Nicht-Nagerspezies das GM in dieser Arbeit auf seine Eignung für den Einsatz synthetischer Gestagene am Beispiel von LNG überprüft. Zu diesem Zweck wurden zwei Versuche durchgeführt.

In einem Vorversuch wurden Methoden auf ihre Praktikabilität und Aussagekraft geprüft, das physiologische Zyklusgeschehen „*in life*“ beim GM zu beurteilen.

Im anschließenden Hauptversuch wurden GMe über 24 Tage intramuskulär mit LNG behandelt. Der Zyklus der Tiere wurde mit den Methoden beurteilt, die im Vorversuch aussagekräftige Ergebnisse für die Bestimmung des Zyklusstandes zeigten. Zusätzlich wurden in regelmäßigen Abständen die Wirkstoffspiegel bestimmt. Am Ende der Behandlung wurden die Tiere getötet und eine Auswahl von Organen makroskopisch und mikroskopisch untersucht.

5.1 Beurteilung der Methoden des Vorversuches

Bei insgesamt 6 Minischweinen wurde über einen Zeitraum von 6 Wochen der Duldungsreflex, die Rötung/Schwellung der Vulva, die Bildung von Vaginalsehlim, die Vaginalzytologie, die Ultraschalluntersuchung des Uterus und der Ovarien sowie die Bestimmung der Plasmakonzentrationen von LH, FSH, P4 und E2 gemessen.

5.1.1 Duldungsreflex

Die Ergebnisse des Vorversuches zeigten, dass der Duldungsreflex bei allen Tieren ausgelöst werden konnte sowie die Länge des Zyklus und den Brunstzeitraum zuverlässig anzeigte. Dies wurde durch die Korrelation mit der Rötung/Schwellung der Vulva, gebildeten Vaginalsehlim und gemessenen Hormonkonzentrationen bestätigt. Die Zeitpunkte des natürlich ausgelösten Duldungsreflexes wichen z. T. leicht von denen des artifiziell durch den Menschen ausgelösten Duldungsreflexes ab.

Bei Tier 3 konnte während des Estrus (Versuchstag 1-3) kein Duldungsreflex artifiziell ausgelöst werden, obwohl die übrigen Parameter eindeutig eine Brunst erkennen ließen. Bei Tier 6 konnte der Duldungsreflex bis einschließlich Tag 5 durchgehend ausgelöst werden. In Korrelation hierzu war eine bis Tag 7 andauernde Schwellung der Vulva und Vaginalsehlim sowie ein erneuter Anstieg der LH-Konzentration an Tag 6 bei diesem Tier zu beobachten.

Die Bestimmung der Zykluslängen gemessen am Duldungsreflex zeigte, dass unter Einbeziehung der Hormonkonzentrationen der natürlich ausgelöste Duldungsreflex das Einsetzen der Brunst treffender charakterisierte als der manuell ausgelöste Duldungsreflex. Dies liegt vermutlich daran, dass der Eber die Paarungsbereitschaft der Sau durch zusätzliche Faktoren, wie z. B. seinen Geruch, Lautäußerungen und Stöße in die Flanke positiv beeinflusst [Plonait, H. (2004)]. Bei Tier 3 war der Reiz des Menschen für die Auslösung eines Duldungsreflexes offensichtlich nicht stark genug.

Daher wurde für den Hauptversuch die natürliche Auslösung des Duldungsreflexes, wie bereits von zahlreichen anderen Autoren beschrieben, als Hauptparameter für das Erkennen der Brunst eingesetzt [Eliasson, L. (1989)]; [Holtz, W. and Bollen, P. (1999)]; [Soede, N. M. and Kemp, B. (1997b)].

5.1.2 Rötung/Schwellung der Vulva

Rötungen und Schwellungen werden sekundär durch die Erhöhung des E2-Spiegels im Blut hervorgerufen [Steiner, R. A. *et al.* (1977)]. Rötungen und Schwellungen der Vulva traten bei allen Tieren während des Brunstzeitraumes auf, bewertet wurden jedoch nur Befunde, die an zwei oder mehr aufeinander folgenden Tagen auftraten. Das Einsetzen der Rötungen war bei den meisten Tieren vor dem Einsetzen von Schwellungen zu beobachten. Im ersten beobachteten Brunstzeitraum traten Rötungen und Schwellungen bei allen Tieren mindestens einen Tag vor dem Duldungsreflex auf. In der zweiten beobachteten Brunst waren nur Rötungen regelmäßig vor der Brunst zu erkennen, die Schwellungen traten z. T. erst mit dem Einsetzen der Brunst auf. Die Intensität der Rötungen zeigte nur eine ungefähre Korrelation mit dem Einsetzen der Brunst.

Tier 6 zeigte außer im Proestrus/Estrus zusätzlich an Tag 14-15 Vulvaschwellungen, die mit einer erhöhten Estradiolkonzentration in diesem Zeitraum korrelierten. Bei Tier 3 wurde eine erhöhte Estradiolkonzentration im gleichen Zeitraum ermittelt, ohne dass Vulvaschwellungen beobachtet wurden.

Die Rötungen/Schwellungen der Vulva traten in unmittelbarem zeitlichen Zusammenhang mit der Brunst auf. Aufgrund ihrer hohen Variabilität sind diese jedoch nicht geeignet, als alleiniger Parameter für die Zykluskontrolle zu fungieren [Schilling, E. and Rostel, W. (1964)]. Die Beurteilung der Vulva auf Rötung/Schwellung wurde daher im Zusammenspiel mit weiteren Parametern im Hauptversuch durchgeführt.

5.1.3 Bildung von Vaginalschleim

Das Auftreten von Vaginalschleim zeigte eine erkennbare Zyklusabhängigkeit und trat im Zeitraum von 3 Tagen vor bis 7 Tagen nach der Brunst auf. Vaginalschleim war überwiegend im Estrus, vereinzelt im Proestrus und teilweise im Postestrus zu beobachten. Anhand der Qualität (klar bzw. trüb) und der Konsistenz (flüssig bzw. fadenziehend) konnte zu keinem Zeitpunkt auf den Zyklusstand geschlossen werden, da der beobachtete Vaginalschleim fast ausschließlich trüb und fadenziehend war. Das Auftreten von Vaginalschleim deutete lediglich darauf hin, dass sich das jeweilige Tier im Proestrus, Estrus oder Postestrus befand. Weitergehende Schlussfolgerungen waren nicht möglich. Im Hauptversuch wurde daher nur der Parameter der Quantität des Vaginalschleims beurteilt.

5.1.4 Vaginalzytologie

Für das Yucutan Minischwein ist bei täglicher Probennahme eine Zuordnung der Zyklusstadien anhand der Vaginalzytologie beschrieben [Rodgers, J. B., Sherwood, L. C., Fink, B. F., and Sadove, R. C. (1993)]. Im Estrus wurde hier eine permanente erhöhte Anzahl von Epithelzellen beobachtet. In diesem Vorversuch war keine erkennbare zyklusgesteuerte Rhythmik, die die Zuordnung der Vaginalzytologie zu einem Zyklusstadium ermöglicht hätte, zu erkennen. Dadurch konnten Ergebnisse einer früheren Veröffentlichung bestätigt werden [Schilling, E. and Rostel, W. (1964)]. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Vaginalzytologie als ungeeignet bewertet und daher nicht im Hauptversuch verwendet.

5.1.5 Ultraschalluntersuchung

Als problematisch erwies sich von Anfang an die Auswahl einer geeigneten Untersuchungstechnik. Da eine Untersuchung aufgrund der Größe der Schallköpfe beim Minischwein weder transrektal noch transvaginal erfolgen konnte, wurde die Untersuchung transabdominal im Bereich der Kniefalte der Tiere durchgeführt. Als schwierig erwies sich dabei im Besonderen, die Tiere während der Untersuchung ohne die Anwendung von Zwangsmaßnahmen ruhig zu halten. Bei Fixierung der Tiere war aufgrund von Abwehrreaktionen und der angespannten Bauchdecke eine Untersuchung nicht möglich. Erst gegen Ende der Untersuchung war die Methode so an die Bedingungen für die Minischweine angepasst, dass interpretierbare Ergebnisse erfasst werden konnten (vergleiche 4.1.5).

Die Ovarien ließen sich ultrasonographisch gut darstellen, sodass eine Unterscheidung der Funktionskörper des Ovars in Follikel und Corpora lutea vorgenommen werden konnte. Im Uterus gelang es nicht, das nur wenige Millimeter dicke Endometrium per Ultraschall zu vermessen.

Im Hauptversuch wurden daher nur die Ovarien per Ultraschall untersucht und eine Beurteilung der Gelbkörper und Follikel vorgenommen.

5.1.6 Bestimmung der endogenen Hormonkonzentration

LH

Alle Tiere zeigten mit Einsetzen des Estrus den charakteristischen präovulatorischen LH-Peak [Engelhardt, W. v. and Breves, G. (2005)]. Die LH-Messungen im Vorversuch von bis zu 10 ng/mL waren mit den Ergebnissen anderer Autoren vergleichbar [Soede, N. M., Helmond, F. A., Schouten, W. G., and Kemp, B. (1997a)]; [Howard, P. K. *et al.* (1983)]; [Tilton, J. E. *et al.* (1982)]. Maximale Konzentrationen wurden an Zyklustag 1 bis 3 erreicht, wobei bei 4 von 6 Tieren der LH-Peak an Tag 1 auftrat. Bei Tier 6 wurden von Tag 2 bis Tag 4 und erneut an Tag 6 LH-Konzentrationen von über 10 ng/mL gemessen, der DR war bei diesem Tier bis einschließlich Tag 5 zu beobachten. Somit korrelierte die vermehrte LH-Produktion mit der Verlängerung des Duldungsreflexes. Bei Tier 5, das eine Zykluslänge von 18 Tagen besaß, wurde im ersten vollständig beobachteten Zyklus eine LH-Konzentration von über 10 ng/mL an Tag 15 des Zyklus gemessen.

FSH

Die Konzentrationen bei 5 von 6 Tieren bewegten sich zwischen 0,5 ng/mL und 7,8 ng/mL. Eine Ausnahme bildete Tier 4, das mit Messwerten zwischen 9,6 ng/mL und 21,3 ng/mL um das ca. 3-fache über dem Gruppendurchschnitt lag. Insgesamt schwankten die FSH-Konzentrationen nur geringfügig während des Zyklus und waren stets höher als die des LH, das nur während des präovulatorischen LH-Peaks höhere Plasmakonzentrationen als das FSH erreichte. Ein präovulatorischer FSH-Anstieg war nicht zu beobachten, was mit den Angaben von Plonait übereinstimmt [Plonait, H. (2004)].

17-β-Estradiol (E2)

Die Estradiolkonzentrationen lagen bei drei Tieren in der lutealen Phase überwiegend unterhalb der Nachweisgrenze von 3 pg/mL und damit um den Faktor 7 deutlich niedriger als in der Literatur beschrieben [Damm Jorgensen, K. (1998)]. Die Peaks im Estrus korrelierten nicht unmittelbar mit den durch Estradiol hervorgerufenen Schwellungen der Vulva. Alle Tiere zeigten im Vorversuch einen deutlichen Anstieg der Konzentrationen zum Ende des Proestrus/Beginn des Estrus. Erwartungsgemäß war am Ende des Beobachtungszyklus ein erneuter E2-Anstieg zu beobachten [Damm Jorgensen, K. (1998)]. Nur Tier 2 zeigte keinen E2-Anstieg. Diese Beobachtung korrelierte mit einer vereinzelt, nur mittelgradigen Schwellung der Vulva an Tag 21.

Progesteron (P4)

Da Progesteron überwiegend im CL produziert wird, muss jedem deutlichen Anstieg der Progesteronkonzentration eine Ovulation vorangegangen sein. Die Zunahme der Progesteronkonzentrationen wurde ab Tag 3 des Zyklus beobachtet und erreichte maximale Werte, wie in der Literatur beschrieben, zwischen Tag 9 und 15 [Cavazos, L. F. *et al.* (1969)]; [Plonait, H. (2004)]. Der Zeitpunkt der maximalen Konzentration konnte aufgrund des Messintervalls nur auf 1 bis 3 Tage genau vorausgesagt werden. Die deutliche Differenz der maximalen Werte von 30,1 ng/mL bis 64,4 ng/mL ist wahrscheinlich auf eine unterschiedliche Zahl von Gelbkörpern pro Tier zurückzuführen. Da im Vorversuch keine postmortalen Untersuchungen durchgeführt wurden, konnte diese Vermutung nicht belegt werden. Bei Tier 6, das einen erhöhten LH-Spiegel bis Tag 4 und erneut an Tag 6 aufwies, zeigte der an Tag 4 bis 16 ansteigende P4-Spiegel einen um ca. 20% höheren Wert als bei den anderen Tieren. Die Ursache hierfür liegt möglicherweise in einer durch den doppelten LH-Peak hervorgerufenen erhöhte Ovulationsrate und einer daraus resultierend vermehrten Anzahl P4-sezernierenden Gelbkörper.

5.1.7 Zusammenfassung

Die ermittelten Zykluslängen von 18 bis 21 Tagen unterschieden sich von der in der Literatur beschriebenen physiologischen Zykluslänge bei Minischweinen nicht [Damm Jorgensen, K. (1998)]; [Schnurrbusch, U. *et al.* (1975)]. Obwohl die Göttinger Minischweine versuchsbedingt vermehrtem Stress wie z. B. Blutentnahmen für verschiedene Untersuchungen ausgesetzt waren, blieb die Zykluslänge unverändert, während die Brunstsymptome in der nachfolgenden Brunst reduziert waren. So waren Inzidenz und Intensität von Rötung/Schwellung der Vulva und das Auftreten von Vaginalseim in der zweiten Brunst vermindert. Dies ist möglicherweise als Einfluss von vermehrtem Stress auf den Zyklus zu werten, der durch die häufigen Untersuchungen/Abnahmen von Blut hervorgerufen wurde. In der Literatur werden stressbedingte Einflüsse auf das Reproduktionsverhalten überwiegend auf Unregelmäßigkeiten bei der Fütterung zurückgeführt [Elze, K. (1989)].

Im Vorversuch erwiesen sich der natürliche Duldungsreflex, die Rötung/Schwellung der Vulva, das Auftreten von Vaginalseim, die Ultraschalluntersuchung der Ovarien und die Hormonbestimmungen für die Charakterisierung des Zyklus als geeignet. Der artifizielle Duldungsreflex, die Beurteilung von Qualität und Konsistenz des Vaginalseims, die Vaginalzytologie und die Ultraschalluntersuchung des Uterus zeigten sich nicht aussagekräftig genug und daher als ungeeignet für den nachfolgend beschriebenen Hauptversuch.

5.2 Beurteilung der Ergebnisse des Hauptversuches

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Charakterisierung der pharmakologischen Wirkungen von synthetischen Gestagenen beim Göttinger Minischwein am Beispiel von LNG. Pharmakologische Wirkungen wurden während der „in-life“ Phase anhand eines intakten Ovarialzyklus bzw. einer Ovulationshemmung beurteilt. Ein intakter Zyklus ist durch ein charakteristisches, zyklusabhängiges Profil der endogenen Sexualhormone, das Auftreten von Brunstsymptomen und einer Ovulation mit anschließender Gelbkörperbildung gekennzeichnet. Im Falle einer Ovulationshemmung treten keine Brunstsymptome auf und die Hormonkonzentrationen zeigen eine nur basale Sekretion. Durch das Aussetzen der Ovulation unterbleibt die Gelbkörperbildung und somit auch die Progesteronproduktion, welche durch die Messung der Hormonspiegel im Blut sowie durch eine Ultraschalluntersuchung der Ovarien diagnostiziert werden kann. Kommt es trotz Ausbleiben der Brunstsymptome zu einer Ovulation so spricht man von einer stillen Brunst [Ogasa, A. *et al.* (1993)]; [Benjaminsen, E. *et al.* (1981)]; [Dziuk, P. J. (1960)]; [Wagner, J. F. *et al.* (1961)]. Ursache hierfür kann Stress sein, der sich negativ auf das Reproduktionsverhalten der Tiere auswirkt.

In der vorliegenden Arbeit wurden eine Kontrollgruppe und drei Dosisgruppen Göttinger Minischweine über einen Zeitraum von 24 Tagen intramuskulär mit LNG behandelt. Die Dosierungen wurden dabei so gewählt, dass die Schwellendosis von LNG für die Ovulationshemmung beim Göttinger Minischweinen eingegrenzt werden konnte.

Die Ovulationshemmung wurde anhand der Hormonkonzentrationen, insbesondere der P4-Konzentration im Verlauf des Zyklus beurteilt. Die Hormonanalysen erfolgten nach Beendigung der „in life“ Phase, sodass die zuverlässige Beurteilung einer Ovulationshemmung erst retrospektiv erfolgen konnte.

Anhand der gemessenen Hormonkonzentrationen konnte bei allen Tieren der Kontrollgruppe und der niedrigen Dosisgruppe das Auftreten von Ovulationen gezeigt werden, während in der mittleren und hohen Dosisgruppe ausnahmslos Ovulationshemmungen beobachtet wurden. Vor Beginn der Behandlung war bei allen Tieren ein intakter Zyklus mit typischem präovulatorischen LH-Peak und deutlichem postovulatorischen P4-Anstieg zu erkennen. Bei den Tieren der Kontrollgruppe und niedrigen Dosisgruppe blieb während der Behandlung das Hormonprofil unverändert und somit der Zyklus unbeeinflusst. Dagegen trat bei den Tieren der mittleren und hohen Dosisgruppe mit Einsetzen der Behandlung kein erneuter LH-Peak und kein P4-Anstieg auf. Die FSH-Konzentration zeigten in der niedrigen Dosisgruppe eine Zyklusabhängigkeit über den gesamten Versuchszeitraum, in der mittleren Dosisgruppe war die Zyklusabhängigkeit nur bis kurz nach Einsetzen der Behandlung bis Tag 13 zu beobachten. In der hohen Dosisgruppe zeigten die Tiere nur bis Tag 10, dem Einsetzen der Behandlung, zyklusabhängige FSH-Konzentrationen. Dieser Effekt ist auf die gestagene Wirkung von LNG zurückzuführen, die einen negativen Feedback auf die Gonadotropinfreisetzung in der Hypophysen-Hypothalamus Achse hervorruft [Engelhardt, W. v. and Breves, G. (2005)].

Die Ergebnisse der während der „*in life*“-Phase durchgeführten ultrasonographischen Untersuchung der Ovarien korrelierten mit den gemessenen endogenen Hormonkonzentrationen. Um den Zeitraum der Brunst (im Vorzyklus Tag -21 bis -19 und zu Versuchsbeginn an Tag 1) waren erwartungsgemäß keine Gelbkörper bei allen Tieren per Ultraschall darstellbar. Der Behandlungsbeginn an Tag 10 lag bei allen Tieren in der Gelbkörperphase, weshalb alle Tiere in diesem Zeitraum Gelbkörper aufwiesen. Während der Behandlung waren in der Kontrollgruppe und der niedrigen Dosisgruppe während der nachfolgenden Brunst um Tag 21 keine Gelbkörper zu erkennen. Im anschließenden Zyklus konnten jedoch erneut Gelbkörper von Tag 24 bis 26 bis zum Versuchsende detektiert werden. Auch in der mittleren und hohen Dosisgruppe bildeten sich während der Behandlung die bestehenden Gelbkörper bis zur ersten erwarteten Brunst nach Behandlungsbeginn zurück. Im weiteren Versuchsverlauf konnten bei den Tieren der mittleren und hohen Dosis keine erneuten Gelbkörper im Ultraschall dargestellt werden. Eine Ausnahme bildete Tier 12, bei dem an Tag 31 ein Gelbkörper ultrasonographisch diagnostiziert wurde. Da nur ein Gelbkörper an nur einem Untersuchungstag beobachtet wurde und weder die LH- noch die P4-Konzentrationen einen Hinweis auf eine Ovulation lieferten, konnte das Auftreten dieses Funktionskörpers nicht erklärt werden. Darüber hinaus wurde dieser Befund weder bei der 4 Tage später stattfindenden makroskopischen, noch bei der mikroskopischen Untersuchung der Ovarien bestätigt.

Bei der postmortalen Untersuchung zeigte sich bereits makroskopisch, dass ein auffälliger Größenunterschied der Ovarien zwischen den Tieren der Kontrollgruppe und niedrigen Dosisgruppe gegenüber jenen der mittleren und hohen Dosisgruppe bestand. In der Kontrollgruppe und der niedrigen Dosisgruppe waren die Ovarien von normaler Größe. Histologisch wurden neben Follikeln verschiedener Größen auch Corpora lutea des gegenwärtigen Zyklus sowie Corpora albicantia des vorangegangenen Zyklus beobachtet. Dagegen waren die Ovarien der Tiere der mittleren und hohen Dosisgruppe deutlich verkleinert, histologisch wurden neben Follikeln verschiedener Größen nur Corpora albicantia entdeckt.

Aus klinischer Sicht ist der Duldungsreflex der wichtigste Parameter für das Einsetzen der Brunst und wurde daher für die Definition des ersten Versuchstages herangezogen. Als Brunst wurden dabei mindestens zwei aufeinander folgende Duldungsreflexe gewertet. Während des Vorzyklus und zu Versuchsbeginn zeigten alle Tiere – gemäß der oben genannten Definition – eine deutliche Brunst, was die Aussagekraft dieses Parameters unter physiologischen Bedingungen unterstreicht. Während des Behandlungszeitraumes war nur bei den Tieren der Kontrollgruppe eine Brunst zu beobachten. In der niedrigen Dosisgruppe trat keine Brunst auf. Wie bereits anhand der Hormonanalysen und Ultraschallbefunde belegt, zeigten alle Tiere dieser Gruppe eine Ovulation. Daher kann bei den Tieren der niedrigen Dosisgruppe von einer stillen Brunst gesprochen werden. In der mittleren und hohen Dosisgruppe waren keine Anzeichen einer Brunst vorhanden, was mit den Ergebnissen der Hormonbestimmung und den ultrasonographischen Befunden korreliert.

Weitere Brunstsymptome sind Rötung und Schwellung der Vulva sowie die Bildung von Vaginalsehlim. Vulvaschwellungen traten analog zum Duldungsreflex während des Behandlungszeitraumes nur in der Kontrollgruppe auf. Deutliche Vulvarötungen während des Behandlungszeitraumes waren ebenfalls nur bei den Kontrolltieren zu beobachten und korrelierten somit mit dem Auftreten von Vulvaschwellung und Duldungsreflex. Ausschließlich mittlere Vulvarötungen traten in der niedrigen Dosisgruppe auf und gaben einen Hinweis auf eine mögliche Brunst. Der Vaginalsehlim dagegen wurde aufgrund seines inkonsistenten Auftretens bereits während des Vorzyklus nicht für die Charakterisierung des Zyklus herangezogen. In der Gesamtbetrachtung erwiesen sich die hier beschriebenen klinischen Parameter weder einzeln, noch in Kombination als geeignet, zwischen einer Ovulation und einer Ovulationshemmung mit ausreichender Sicherheit zu diskriminieren.

Am Versuchende wurden makroskopische und mikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Bei 9 von 12 Tieren waren die Darmbeinlymphknoten (Lnn. iliaci) gerötet und/oder vergrößert, histologisch zeigte sich eine Blut- und Ölesorption. Diese Befunde sind auf die intramuskuläre Applikation einer öligen Formulierung in die lange Sitzbeinmuskulatur, die zum Einzugsgebiet des Darmbeinlymphknotens gehört, zurückzuführen. Makroskopisch traten außer den oben beschriebenen Ovarienveränderungen keine weiteren Befunde auf. Alle Tiere befanden sich aufgrund der Ovarienbefunde im Diestrus.

Mikroskopisch waren deutliche Befunde vor allem im Uterus vorhanden. In den beiden Uterushörnern war bei den Tieren der mittleren und hohen Dosisgruppe eine Zunahme der endometrialen Epithelhöhe zu erkennen. Diese korrelierte mit einer Erhöhung der Anzahl der Kernreihen von 1 bis 2 auf 2 bis 3. Unterschiedliche Endometriumepithelhöhen werden zu verschiedenen Phasen des Diestrus in der Literatur beschrieben [Leiser, R. *et al.* (1988)]. Die gemessenen Endometriumepithelhöhen liegen dabei im Bereich der bei Fabian beschriebenen Werte [Fabian, G. (2004)]. In beiden Uterushörnern war ein vermehrtes Auftreten von zytoplasmatischen Sekretgranula sowie eine unregelmäßige Oberfläche des Endometriumepithels zu beobachten. Das Auftreten des endometrialen Drüsenepithels bildet beim Schwein keine so bedeutende Rolle wie z. B. beim Hund [Leiser, R., Zimmermann, W., Sidler, X., and Christen, A. (1988)]; [Düsterberg, B. *et al.* (1984)]. Das Gesamtbild dieser Befunde aus dieser Studie zeigt sowohl eine Proliferation, als auch eine Sekretion. Sekretorische Effekte auf den Uterus werden als eine der Hauptwirkungen von Gestagenen, insbesondere von LNG als die klassische Wirkung, auf dieses Zielorgan beurteilt. Zur Testung der gestagenen Wirkung werden in der Regel ovariectomierte Tiermodelle verwendet, bei denen aufgrund mangelnder eigener Estrogenproduktion exogenes Estrogen zugeführt werden muss, um die physiologische, zyklische Proliferation des Endometriumepithels auszulösen [Beier, S. *et al.* (1983)].

Erst am proliferierten Endometrium kann sich die Wirkung eines Gestagens, die Umwandlung des Endometriumepithels von der Proliferations- in die Sekretionsphase, entfalten und festgestellt werden. Entscheidend für den Grad der Proliferation ist das Estrogen/Gestagen-Verhältnis, das bei jeder Spezies individuell unterschiedlich ausgeprägt ist. Bei der Gabe exogener Hormone kann es im Falle eines Missverhältnisses zu einer synergistischen oder antagonistischen Reaktion der beiden Hormone kommen, was zu einer übermäßigen Stimulation des Endometriumepithels kommen kann [Beier, S., Düsterberg, B., El Etreby, M. F., Elger, W., Neumann, F., and Nishino, Y. (1983)]; [Pasquale, S. A. (1989)].

Durch die Bestimmung der Wirkstoffspiegel wurde die kontinuierliche Exposition der Tiere mit LNG gezeigt. Über den Behandlungszeitraum war eine mittlere Akkumulation des Wirkstoffspiegels um den Faktor 3,5 in der 0,02 mg/kg/Tag Dosisgruppe und um den Faktor 2,3 in der 0,1 mg/kg/Tag Dosisgruppe zu erkennen.

Von Seiten anderer Autoren wurde beim Hund nach subkutaner Gabe von LNG über 14 Tage in öliger Formulierung keine Akkumulation des Wirkstoffes beobachtet [Düsterberg, B. and Beier, S. (1984)]. Die Exposition der Tiere lag bei gleicher Dosis (0,1 mg/kg/Tag) und vergleichbarem Applikationsweg (s.c. bzw. i.m.) im Mittel um den Faktor 4 unter der Exposition bei den Göttinger Minischweinen.

6 Schlussfolgerung

Gegenüber anderen Tiermodellen weist das Göttinger Minischwein mehrere Vorzüge auf. Durch seine ausgeprägte Ähnlichkeit in Physiologie, Metabolismus und Pharmakologie ist das Göttinger Minischwein sehr gut für einen Vergleich mit dem Menschen geeignet. Daher wird es zunehmend als Tiermodell in pharmakologischen und toxikologischen Fragestellungen eingesetzt und besitzt deutliche Vorteile gegenüber dem Hund und den Primaten [Svendsen, O. *et al.* (1985)]; [Witkamp, R. F. and Monshouwer, M. (1998)]. Die eingesetzten Dosierungen sind mit denen anderer Spezies und der des Menschen vergleichbar [Günzel, P., Putz, B., Lehmann, M., Hasan, S. H., Hümpel, M., and El Etrey, M. F. (1989)]; [Lehmann, M. *et al.* (1989)].

Als spontan ovulierende, ganzjährig polyestrische Spezies kann das Minischwein jahreszeitlich unabhängig für die Testung von Steroidhormonen eingesetzt werden. Dies ist insbesondere ein Vorteil gegenüber dem Hund, der als saisonal diestrische Spezies nur zweimal pro Jahr für zyklusabhängige Studien verwendet werden kann. Ferner bietet das Göttinger Minischwein aufgrund seiner Größe und seines großen Blutvolumens die Möglichkeit, im gewünschten Umfang Blutproben zu gewinnen. Durch das im Gegensatz zum Hausschwein deutlich geringere Körpergewicht und aufgrund guter pharmakokinetischer Eigenschaften reicht bei dieser Spezies der Einsatz kleinerer Substanzmengen aus. Dies ist von großer Bedeutung, da die Synthese von Prüfsubstanz in der frühen präklinischen Phase einen hohen zeitlichen und damit finanziellen Aufwand darstellt. Zusätzlich lassen sich beim Minischwein die Ovarien „*in vivo*“ per Ultraschalluntersuchung non-invasiv auf Funktionskörper untersuchen. Bei Nagern ist eine vergleichbare Untersuchung der Ovarien nur postmortal möglich.

Zum jetzigen Zeitpunkt sind für das Göttinger Minischwein aufgrund seines relativ neuen Einsatzes bei Forschungsvorhaben oft noch wenig Vergleichsdaten vorhanden. Außerdem zeigt das Göttinger Minischwein, wie auch die großen Schweinerassen, eine Anfälligkeit gegenüber Stresseinflüssen.

Die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse zeigen jedoch deutlich, dass das Göttinger Minischwein als Tiermodell, insbesondere für den Einsatz synthetischer Gestagene, sehr gut geeignet ist. Dies wird auch durch die zunehmende Anzahl von Studien mit Minischweinen für Forschungszwecke deutlich.

7 Zusammenfassung

Um das Göttinger Minischwein als Versuchstier für endokrin-pharmakologische Fragestellungen einsetzen zu können, müssen die pharmakologischen Wirkungen der Substanzen auf den Zyklus der Tiere beurteilt werden können. In einem Vorversuch wurden zunächst Methoden auf ihre Anwendbarkeit und Aussagekraft geprüft, das Zyklusgeschehen an sechs weiblichen Minischweinen zu charakterisieren. Als geeignet erwiesen sich der natürliche Duldungsreflex, die Rötung/Schwellung der Vulva, die Beurteilung von Vaginalsehlim, die Ultraschalluntersuchung der Ovarien sowie die Bestimmung der Plasmakonzentrationen von LH, FSH, 17- β -Estradiol und Progesteron. In dem nachfolgenden Hauptversuch wurden 12 weibliche Tiere (1 Kontrollgruppe, 3 Dosisgruppen) über einen Zeitraum von 24 Tagen intramuskulär mit LNG, einem synthetischen Gestagen, behandelt. Ziel der Behandlung war es, die Ovulation der Tiere zu hemmen und die Schwellendosis für eine Ovulationshemmung zu ermitteln.

Als niedrigste pharmakologisch wirksame Dosis für eine Ovulationshemmung wurde 0,02 mg/kg/Tag LNG ermittelt. In der 0,002 mg/kg/Tag Dosisgruppe waren durch das Verhalten und die Veränderungen am äußeren Genital keine eindeutigen Brunstsymptome zu erkennen. Eine Ovulation konnte jedoch durch die Ultraschalluntersuchung, die Histologie der Ovarien sowie die Messung der Hormonkonzentrationen nach Ende des Versuchs bestätigt werden. In der 0,02 mg/kg/Tag und der 0,1 mg/kg/Tag LNG Dosisgruppe zeigten sowohl das Verhalten der Tiere wie auch alle übrigen Parameter eine eindeutige Unterbrechung des Sexualzyklus an, dass keine Ovulation stattfand. Dabei traten in der mittleren und hohen Dosisgruppe außer am Ovar auch substanzbedingte Effekte an Vagina und Uterus sowie bei den Organgewichten auf. Diese Ergebnisse korrelierten mit bereits bekannten Wirkungen bei anderen Spezies, wie z. B. der Ratte.

Das Tiermodell des Göttinger Minischweins erwies sich daher als sehr geeignet, pharmakologische Hormonwirkungen auf den Sexualzyklus des Göttinger Minischweins zu erfassen. Dies traf ebenfalls auf die Auswahl der Methoden zu, die eine zusätzliche Möglichkeit boten, gestagene Wirkungen von Hormonen und anderen Substanzen in toxikologischen Studien zu untersuchen.

8 Summary

Effects of levonorgestrel on the ovarian cycle of Göttingen minipigs

To be able to use the Göttingen minipig as an experimental animal model for endocrinological and pharmacological objectives, it must be possible to evaluate the pharmacological effect of a substance on the ovarian cycle of the animals. In a preliminary study, methods were tested for their practicability and significance to characterize the cycle by using six female minipigs. Suitable proved to be the natural toleration reflex, the redness/swelling of the vulva, the evaluation of the vaginal mucus, the ultrasound examination of the ovaries as well as the determination of the plasma concentrations of luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, 17- β -estradiol and progesterone. In a main study, 12 female animals (3 treatment groups, 1 control group) were treated intramuscularly for 24 days with levonorgestrel (LNG), a synthetic gestagen. The aim was to inhibit the ovulation of the animals and to determine the threshold dose for the inhibition of ovulation.

The lowest pharmacologically effective dose for the inhibition of ovulation was determined to be 0.02 mg/kg/day LNG. In the 0.002 mg/kg/day dose group, no clear estrus symptoms were evident on the outer genital. However, ovulation was confirmed by an ultrasound examination as well as the hormone concentrations at the end of the study. In the 0.02 mg/kg/day and 0.1 mg/kg/day dose groups, both behavior and all other measured parameters showed a clear interruption of the sexual cycle, and no ovulation occurred. Animals in both the mid- and high dose groups showed substance related effects, not only on the ovary but also on the vagina, uterus, and the organ weights. These results correlated with known effects observed in other species, e.g. the rat.

Overall, the Göttinger minipig proved to be a very suitable animal model to test pharmacological hormone effects on the sexual cycle of the minipig. This was also applicable to the choice of methods, which offered an additional possibility to evaluate the gestagenic effects of hormones and other substances in toxicology studies.

9 Literaturübersicht

1. Abel M. H. und Baird D. T. (1980). The effect on 17- β -estradiol and progesterone on prostaglandin production by human endometrium maintained in organ culture. *Endocrinology* 106, 1599-1606.
2. Baake M. und Gilles A. (1994). *Hämatologie*, Darmstadt: GIT Verlag GmbH.
3. Baker R. D. und Coggins E. G. (1968). Control of ovulation rate and fertilization in prepuberal gilts. *J.Anim.Sci.* 27, 1607-1610.
4. Baker R. D., Downey B. R., und Brinkley H. J. (1973). Induction of ovulation in pigs with gonadotropin releasing hormone. *J.Anim.Sci.* 37, 1376-1379.
5. Barbe C., Schnurrbusch U., und Wähner M. (2004). Unterschiedliche Methoden der Zyklusstimulation bei primiparen Sauen unter Betrachtung der Sexualhormone LH, FSH, 17 β -Östradiol und Progesteron. *Schriftenreihe der LfL* 3. Jg., 46-61.
6. Beattie C. W. und Corbin A. (1975). The differential effects of diestrous progestogen administration on proestrous gonadotropin levels. *Endocrinology* 97, 885-890.
7. Beier S. und andere (1983). Toxicology of Hormonal Fertility-Regulating Agents. In *Endocrine Mechanisms in Fertility Regulation* G Benagiano und E Diczfalusy, Eds., S. 261-346. Raven Press, New York.
8. Benjaminsen E. und Karlberg K. (1981). Post weaning oestrus and luteal function in primiparous and pluriparous sows. *Res.Vet.Sci* 30, 318-322.
9. Bollen P. und Ellegaard L. (1997). The Gottingen minipig in pharmacology and toxicology. *Pharmacol.Toxicol.* 80 Suppl 2, 3-4.
10. Branscheid W. und Holtz W. (1988). Histochemical examination of the vaginal epithelium of sows at various stages of the estrus cycle. *Anat.Histol.Embryol.* 17, 12-26.
11. Bressers H. P. M., Te Brake J. H. A., und Noordhuizen J. P. T. M. (1991). Oestrus detection in group-housed sows by analysis of data on visits to the boar. *Appl.Anim.Behav.Sci.* 31, 183-193.
12. Brinkley H. J. (1981). Endocrine signaling and female reproduction. *Biol.Reprod.* 24, 22-43.
13. Bustad L. K. (1966). Pigs in the laboratory. *Sci Am.* 214, 94-100.
14. Cavazos L. F., Anderson L. L., Belt W. D., Henricks D. M., Kraeling R. R., und Melampy R. M. (1969). Fine structure and progesterone levels in corpus luteum of the pig during the estrous cycle. *Biol.Reprod.* 1, 83-106.
15. Christenson R. K. und Ford J. J. (1979). Puberty and estrus in confinement-reared gilts. *J.Anim.Sci.* 49, 743-751.

16. Clarke C. L. und Sutherland R. L. (1990). Progesterin regulation of cellular proliferation. *Endocr.Rev.* 11, 266-301.
17. Corbin A. und Gast M. (1998). Das präklinische pharmakologische Profil von Levonorgestrel. In *Levonorgestrel* A Teichmann und A Corbin, Eds., S. 7-24. Stuttgart.
18. Damm Jorgensen K. (1998). Minipig in *Reproduction Toxicology*. *Scand.J.Lab.Anim.Sci.Suppl.* 25.
19. Demers L. M., Feil P. D., und Bardin C. W. (1977). Factors that influence steroid induction of endometrial glycogenesis in organ culture. *Ann.NY.Acad.Sci.* 286, 249-259.
20. Diehl J. R., Stuart L. D., Goodrowe K. L., und Wildt D. E. (1986). Effects of altrenogest and exogenous gonadotropins on ovarian function and embryo recovery in swine leukocyte antigen inbred miniature swine as influenced by cystic endometrial hyperplasia. *Biol.Reprod.* 35, 1261-1268.
21. Ding Y.-Q., Zhu L.-J., Bagchi M. K., und Bagchi I. C. (1994). Progesterone stimulates calcitonin gene expression in the uterus during implantation. *Endocrinology* 135, 2265-2274.
22. Döcke F. (1994). Keimdrüsen. In *Veterinärmedizinische Endokrinologie* F Döcke, Ed., S. 399-498. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena.
23. Döcke F. und Dörner G. (1965). The mechanism of the induction of ovulation by estrogens. *J.Endocr.* 33, 491-499.
24. Downey B. R. und Driancourt M. A. (1994). Morphological and functional characteristics of preovulatory follicles in large white and Meishan gilts. *J.Anim.Sci.* 72, 2099-2106.
25. Düsterberg B. und Beier S. (1984). Plasma levels and progestational activity of levonorgestrel after repeated intravenous and subcutaneous administration in the beagle bitch. *Contraception* 29, 345-357.
26. Düsterberg B., Hümpel M., und Speck U. (1981). Terminal half-lives in plasma and bioavailability of norethisterone, levonorgestrel, cyproterone acetate and gestodene in rats, beagels and rhesus monkeys. *Contraception* 24, 673-683.
27. Dutta C., Stuart L. D., und Chakraborty P. K. (1990). Characterization of cystic endometrial hyperplasia (ceh) in swine leukocyte antigen (sla) miniature swine: serum hormone and endometrial estrogen receptor concentrations. *Anim.Reprod.Sci.* 22, 99-108.
28. Dziuk P. J. (1960). Influence of orally administered progestins on estrus and ovulation in swine. *J.Anim.Sci.* 19, 1319-1320.
29. Edgren R. A. (1994). Issues in Animal Pharmacology. In *Pharmacology of the Contraceptive Steroids* J W Goldzieher, Ed., S. 81-97. Raven Press, Ltd., New York.
30. Elger W., Beier S., Pollow K., Garfield R., Shi S. Q., und Hillisch A. (2003). Conception and pharmacodynamic profile of drospirenone. *J.Steroids.* 68, 891-905.

31. Eliasson L. (1989). A study on puberty and oestrus in gilts. *Zentralbl.Veterinärmed.* 36, 46-54.
32. Elze K. (1989). Analysis of several year of breeding hygiene work. *Tierärztl.Praxis* 17, 372-377.
33. Engelhardt W. v. und Breves G. (2005). *Physiologie der Haustiere*, Enke, Stuttgart.
34. Fabian, G. (2004). Messungen am Endometrium des nulliparen Schweines während des Sexualzyklus.
35. Ferin M. (1999). Ovarian cycle, mammals. *Encyclop.Reprod.* 3, 547-552.
36. Gärtner R. und Haen E. (2001). Endokrinpharmakologie. In *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie* W Forth, D Henschler, W Rummel, U Förstermann, und K Starke, Eds., S. 601-703. Verlag Urban & Fischer, München, Jena.
37. Glodek, P. (1986). Breeding program and population standards of the Göttingen Miniature Swine.
38. Graham J. D. und Clarke C. L. (1997). Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr.Rev.* 18, 502-519.
39. Gräser T., Kytchev R., und Müller A. (2000). Comparison of the efficacy and endometrial safety of two estradiol valerate/dienogest combinations and Kliogest for continuous combined hormone replacement therapy in postmenopausal women. *Climacteric* 3, 109-118.
40. Green S. und Chambin P. (1988). Nuclear receptors enhance our understanding of transcription regulation. *Trends in Genetics* 4, 309-314.
41. Günzel P. und andere (1989). Steroid toxicology and the 'pill': Comparative aspects of experimental test systems and the human. In *Advances in Applied Toxicology* D Dayan und A J Paine, Eds., S. 19-49. Taylor and Francis Ltd.
42. Heikinheimo O., Gordon K., Williams R. F., und Hodgen G. D. (1996). Inhibition of Ovulation by Progestin Analogs (Agonists vs Antagonists): Preliminary Evidence of Different Sites and Mechanisms of Actions. *Contraception* 53, 55-64.
43. Hillesheim H. G., Ritter P., Valentin U., und Hobe G. (1989). Pharmacokinetics of the progestin dienogest (STS 557) in rabbits. *Exp.Clin.Endocrinol.* 94, 194-202.
44. Holtz W. (1996). Die Zyklussteuerung beim Schwein-Eine Standortbestimmung (Kurzmitteilung). *Arch.Tierz.,Dummerstorf* 39, 447-454.
45. Holtz W. und Bollen P. (1999). Pigs and Minipigs. In *The UFAW handbook on the care and management of laboratory animals* Trevor Poole, Ed., S. 464-488. Blackwell Science, London.
46. Holtz W. und Smidt D. (1973). Zykluslänge, Brunstdauer und Brunstverhalten bei weiblichen Miniaturschweinen. *J.interdiscipl.Cycle Res.* 4, 237-250.

47. Howard P. K., Chakraborty P. K., Camp J. C., Stuart L. D., und Wildt D. E. (1983). Pituitary-ovarian relationships during the estrous cycle and the influence of parity in an inbred strain of miniature swine. *J.Anim.Sci.* 57, 1517-1524.
48. Hümpel M. (1989). Comparative pharmacokinetics of selected contraceptive steroids in animal species and man. In *Safety requirements for contraceptive steroids* F Michel, Ed., S. 193-210. Cambridge University Press.
49. Ishwad P. C., Katkam R. R., Hinduja K., Chwalisz K., Elger W., und Puri C. P. (1993). Treatment with a progesterone antagonist ZK09.299 delays endometrial development without blocking ovulation in Bonnet Monkeys. *Contraception* 48, 57-70.
50. Kaneko J. J., Harvey J. W., und Bruss M. L. (1997). *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, Academic Press, San Diego, California.
51. Kilgour R. J. und Choquet D. (1994). The estrous cycle and induction of estrus in the Australian feral sow. *Theriogenology* 41, 1181-1192.
52. Knox R. V. und Tudor K. W. (1999). Influence of norgestomet in combination with gonadotropins on induction of estrus and ovulation in prepubertal gilts. *J.Anim.Sci.* 77, 1348-1352.
53. Knox R. V., Tudor K. W., Rodriguez-Zas S. L., und Robb J. A. (2000). Effect of subcutaneous vs intramuscular administration of P.G. 600 on estrual and ovulatory responses of prepubertal gilts. *J.Anim.Sci.* 78, 1732-1737.
54. Krattenmacher R. (2000). Drospirenone: pharmacology and pharmacokinetics of a unique progestogen. *Contraception* 62, 29-38.
55. Lachnit U. (1971). Action mechanisms of hormonal contraception. *Naturwissenschaften* 58, 352-358.
56. Larsen M. O., Elander M., Sturis J., Wilken M., Carr R. D., Rolin B., und Porksen N. (2002). The conscious Göttingen minipig as a model for studying rapid pulsatile insulin secretion in vivo. *Diabetologie* 45, 1389-1396.
57. Lehmann H. (1998). The minipig in general toxicology. *Scand.J.Lab.Anim.Sci.Suppl.* 25.
58. Lehmann M. und andere (1989). Experimental toxicity studies with contraceptive steroids and their relevance for human risk estimation. In *Advances in Applied Toxicology* D Dayan und A J Paine, Eds., S. 51-79. Taylor & Francis.
59. Leiser R., Zimmermann W., Sidler X., und Christen A. (1988). [Normal cyclical morphology of the endometrium and ovary of swine]. *Tierarztl.Prax.* 16, 261-280.
60. Löffler G. (1998). Transkription und posttranskriptionale Prozessierung. In *Biochemie und Pathobiochemie* G Löffler und P E Petrides, Eds., S. 239-262. Springer Verlag.
61. Lucas P. C. und Granner D. K. (1992). Hormone response domains in gene transcription. *Ann.Rev.Biochem.* 61, 1131-1173.

62. Lydon J. P., DeMayo F. J., Funk C. R., Mani S. K., Hughes A. R., Montgomery Jr. C. A., Shymala G., Conneely O. M., und O'Malley B. W. (1995). Mice lacking progesterone receptors exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes Dev.* 9, 2266-2278.
63. Mahesh V. B., Brann D. W., und Hendry L. B. (1996). Diverse modes of action of progesterone and its metabolites. *J.Steroid Biochem.Molec.Biol.* 56, 209-219.
64. Mahl J. A., Vogel B. E., Court M., Kolopp M., Roman D., und Nogue V. (2006). The minipig in dermatotoxicology: methods and challenges. *Exp.Toxicol.Pathol.* 57, 341-345.
65. Mann E. (1996). Enzymimmunologisch ermittelte Hormonprofile, Ovarreaktion und Embryonenqualität bei mit PMSG superovulierten präpuberalen Jungsauen. Göttingen, Univ.Diss.
66. Moeller R. (1991). Enzymimmunoassays mit zweitem Antikörper für Progesteron und porcinem LH. Göttingen, Univ.Diss.
67. Mortensen J. T., Brinck P., und Lichtenberg S. (1998). The minipig in dermal toxicology. A Literature Review. *Scand.J.Lab.Anim.Sci.Suppl.* 25.
68. Muhn P., Furhman U., Fritzemeier K. H., Krattenmacher R., und Schillinger E. (1995). Drospirenon: a Novel Progestogen with Antimineralocorticoid and Antiandrogenic Activity. *Annals of New York Academy of Science* 761.
69. Oelkers W., Foidart J. M., und Dombrovicz N. (1995). Effects of a new oral contraceptive containing an antimineralocorticoid progeston, drospirenone, on the renin-aldosterone system, body weight, blood pressure, glucose tolerance, and lipid metabolism. *J.Clin.Endocrinol.* 80, 1816-1821.
70. Oettel M. (1996). Endokrinpharmakologie. In *Lehrbuch Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin* H H Frey und W Löscher, Eds., S. 370-423. Enke Verlag, Stuttgart.
71. Ogasa A., Tsutsui T., und Kawakami E. (1993). Ovarian response to hCG in the postweaning sow. *J Vet.Med.Sci* 55, 155-156.
72. Owen L. N. und Briggs M. H. (1976). Contraceptive steroid toxicology in the Beagle dog an its relevance to human carcinogenicity. *Curr.Med.Res.Opin.* 4, 309-329.
73. O'Connell D., Robertson J., Henry D., und Gillespie W. (1998). A systemic review of the skeletal effects of estrogen therapy in postmenopausal women. II: An assessment of treatment effects. *Climacteric* 1, 112-123.
74. Pappenheim A. (1912). Zur Blutzellfärbung im klinischen Bluttrockenpräparat der hämatopoetischen Gewebe nach meiner Methode. *Folia Haematol.* 13, 337-344.
75. Parsons B., MacLusky N. J., Krey L., Pfaff D. W., und McEwen B. S. (1980). The temporal relationship between estrogen-inducible progestin receptors in the female rat brain and the time courses of estrogen activation of mating behaviour. *Endocrinology* 107, 774-779.
76. Pasquale S. A. (1989). Oral contraceptives: significance of their effects in man and relationship to findings in animal models. *Toxicol.Pathol.* 17, 396-400.

77. Plonait H. (2004). Fortpflanzungsphysiologie und Gynäkologie der Sau. In Lehrbuch der Schweinekrankheiten, 4. Auflage H Plonait und K Bickhardt, Eds., S. 399ff. Parey, Berlin.
78. Puri C. P., Elger W., und Pongubala J. M. R. (1987). Induction of menstruation by antiprogestin ZK 98.299 in cycling Bonnet Monkeys. *Contraception* 35, 409-421.
79. Reichert L. E. (1999). FSH (Follicle-Stimulation-Hormone). In: *Encyclopedia of Reproduction*. II, 418-422.
80. Rodgers J. B., Sherwood L. C., Fink B. F., und Sadove R. C. (1993). Estrus detection by using vaginal cytologic examination in miniature swine. *Lab.Anim.Sci.* 43, 597-602.
81. Romeis B. (1989a). Ausstrichpräparate. In *Mikroskopische Technik* H Denk, H Künzle, H Plenk, J Rüschoff, und W Sellner, Eds., S. 477. Böck,P., München-Wien-Baltimore.
82. Romeis B. (1989b). Einbettung der fixierten Schnitte. In *Mikroskopische Technik* H Denk, H Künzle, H Plenk, J Rüschoff, und W Sellner, Eds., S. 113-153. Böck,P., München-Wien-Baltimore.
83. Romeis B. (1989c). Färben der Schnitte. In *Mikroskopische Technik* H Denk, H Künzle, H Plenk, J Rüschoff, und W Sellner, Eds., S. 179-249. Böck,P., München-Wien-Baltimore.
84. Rowlands S. (2003). Newer Progestogens. *Journal of Family Planing and Reproductive Health Care* 29, 13-16.
85. Rupprecht R., Reul J. M., van Steensel B., Spengler D., Söder M., Berning B., Holsboer F., und Damm K. (1993). Pharmacological and functional characterization of human mineralcorticoid and glucocorticoid receptor ligands. *Eur.J.Pharmacol.* 15, 145-154.
86. Savouret J. F., Misrahi M., und Milgrom E. (1990). Molecular action of progesterone. *Int.J.Biochem.* 22, 579-594.
87. Schilling E. und Rostel W. (1964). [Methodical investigations of the estrus diagnosis in sows]. *Dtsch.Tierärztl.Wochenschr.* 71, 429-436.
88. Schnurrbusch U., Mehlhorn I., und Elze K. (1975). Untersuchungen zur Steigerung der Fruchtbarkeitsleistung bei Altsauen. *Arch.Exp.Veterinarmed.* 29, I-III 667-699.
89. Shapiro S. S., Dyer R. D., und Colas A. E. (1980). Progesterone-induced glycogen accumulation in human endometrium during organ culture. *Am.J.Obstet.Gynecol.* 136, 419-425.
90. Sheldrick E. L. und Flick-Smith H. C. (1993). Effects on ovarian hormones on oxytocin receptor concentrations in explants of uterus from ovariectomized ewes. *J.Reprod.Fertil.* 98, 229-233.
91. Signoret J. P. (1970). Reproductive behaviour of pigs. *J.Reprod.Fertil.Suppl* 11, Suppl.
92. Sitruk-Ware R. (2004). Pharmacological profile of progestins. *Maturitas* 47, 277-283.

93. Soede N. M., Helmond F. A., Schouten W. G., und Kemp B. (1997a). Oestrus, ovulation and peri-ovulatory hormone profiles in tethered and loose-housed sows. *Anim.Reprod.Sci.* 46, 133-148.
94. Soede N. M. und Kemp B. (1997b). Expression of oestrus and timing of ovulation in pigs. *J.Reprod.Fertil.Suppl* 52, 91-103.
95. Steiner R. A., Schiller H. S., Illner P., Blandau R., und Gale C. C. (1977). Sex hormones correlated with sex skin swelling and rectal temperature during the menstrual cycle of the pigtail macaque. *Lab.Anim.Sci.* 27, 217-221.
96. Suzuki T., Sasano H., Kimura N., Tamura M., Fukaya T., Yajima A., und Nagura H. (1994). Immunohistochemical distribution of progesterone, androgen and oestrogen receptors in the human ovary during the menstrual cycle: relationship to expression of steroidogenic enzymes. *Human.Reprod.* 9, 1589-1595.
97. Svendsen O., Blom L., Aaes-Jorgensen T., und Larsen J. J. (1985). Local toxicity of different drugs after intramuscular or intralipid injection in pigs: serum concentrations after three different preparations of cis(Z)-clopenthixol. *Acta pharmacol.toxicol.* 57, 78-87.
98. Taubert H. D. und Kuhl H. (1981). Beeinflussung reproduktiver Funktionen durch synthetische Sexualhormone. In *Kontrazeption mit Hormonen* H D Taubert und H Kuhl, Eds., S. 66-103. Thieme Verlag, Stuttgart.
99. Teichmann A. (2003). Pharmacology of estradiol valerate/dienogest. *Climacteric* 6, 17-23.
100. Tilton J. E., Foxcroft G. R., Ziecik A. J., Coombs S. L., und Williams G. L. (1982). Time of the preovulatory LH surge in the gilt and sow relative to the onset of behavioral estrus. *Theriogenology* 18, 227-236.
101. Topper Y. J. und Freemann C. S. (1980). Multiple hormone interactions in the developmental biology of the mammary gland. *Physiol.Rev.* 60, 1049-1106.
102. van de Wiel D. F., Koops W., und Vos E. (1986). Enzyme- and radioimmunoassay techniques for hormone determination in livestock. *Nuclear and related techniques in animal production and health: proceedings of Internat.Symposium on the Use of Nuclear Techniques in Studies of Animal Production and Health in Different Environments*, I.E.A.E.Wien 243-253.
103. van Uem J. F. H. M., Hsiu J. G., Chillik C. F., Danforth D. R., Ulmann A., Baulieu E. E., und Hodgen G. D. (1989). Contraceptive Potential of RU486 by Ovulation Inhibition: Pituitary versus Ovarian Action with Blockade of Estrogen-induced Endometrial Proliferation. *Contraception* 40, 171-184.
104. Wagner J. F. und Seerley R. W. (1961). Synchronization of estrus in gilts with an orally active progestin. *J.Anim.Sci.* 20, 980.
105. Wähler M., Schnurrbusch U., Engelhardt S., Gottschalk J., Scharfe S., und Pfeiffer H. (1993). Zur Konzentration von 17- β -Östradiol und Progesteron in der Follikelflüssigkeit sowie im Muskel- und Fettgewebe bei Schweinen in Abhängigkeit vom Sexualzyklus. *Züchtungskunde* 65, 370-381.

-
106. Wallenhorst S. (1996). Endokrine Reaktion und Embryonenausbeute nach hormoneller Stimulation von Jungsaugen und methodische Versuche zur Embryonenübertragung beim Schwein. Göttingen, Univ.Diss., 3-89712-199-9.
 107. Wiggins E. L., Casida L. E., und Grummer R. H. (1950). The incidence of female genital abnormalities in swine. *J.Anim.Sci.* 9, 269-276.
 108. Wilson C. A. und Leigh A. J. (1992). Endocrine Toxicology of the Female Reproductive System. In *Endocrine Toxicology* C K Atterwill und J D Flack, Eds., S. 319.
 109. Winneker R. C., Bitran D., und Zhang Z. (2003). The preclinical biology of a new potent and selective progestin: trimegestone. *Steroids* 68, 915-920.
 110. Witkamp R. F. und Monshouwer M. (1998). Pharmakokinetics in vivo and in vitro in swine. *Scand.J.Lab.Anim.Sci.Suppl.* 25.
 111. Xi S., Yin W., Wan Z., Kusunoki M., Koike T., Fan J., und Zhang Q. (2004). A minipig model of high-fat/high-sucrose diet-induced diabetes and atherosclerosis. *Int.J.Exp.Pathol.* 85, 223-231.

10 Anhang

10.1 Vorversuch

10.1.1 Einzelwerte

Tabelle 26: Hormonkonzentrationen von Tier 1 während des Vorversuchs

Versuchs- tag	FSH [ng/mL]	LH [ng/mL]	P4 [ng/mL]	E2 [pg/mL]
-2	2,4	0,6	<0,5	6,9
-1	2,9	0,6	<0,5	11,4
1	2,9	8,3	<0,5	21,7
2	2,3	2,1	<0,5	<3,0
3	2,9	1,1	2,3	<3,0
4	2,7	1,1	6,8	<3,0
5	1,5	1,6	17,8	<3,0
6	2,2	0,5	11,6	<3,0
9	2,0	0,4	27,2	<3,0
12	2,3	0,3	19,8	<3,0
15	0,8	1,0	30,5	<3,0
18	0,5	0,7	1,4	<3,0
20	1,2	0,8	<0,5	10,9

FSH – Follikelstimulierendes Hormon, LH – Luteinisierendes Hormon, P4 – Progesteron, E2 – 17- β -Estradiol, ng – Nanogramm, pg – Picogramm, mL – Milliliter

Tabelle 27: Hormonkonzentrationen von Tier 2 während des Vorversuchs

Versuchs- tag	FSH [ng/mL]	LH [ng/mL]	P4 [ng/mL]	E2 [pg/mL]
-1	4,4	0,9	<0,5	12,5
1	4,9	>10	<0,5	13,9
2	4,5	2,2	<0,5	<3,0
3	7,0	1,2	2,7	<3,0
4	4,7	0,6	8,6	<3,0
5	4,6	1,1	12,1	<3,0
6	4,1	1,6	13,9	<3,0
9	4,8	0,4	23,6	<3,0
12	4,9	0,6	30,1	<3,0
15	5,1	0,7	27,4	<3,0
18	4,0	1,4	3,8	<3,0
21	4,9	>10	1	<3,0

FSH – Follikelstimulierendes Hormon, LH – Luteinisierendes Hormon, P4 – Progesteron, E2 – 17- β -Estradiol, ng – Nanogramm, pg – Picogramm, mL – Milliliter

Tabelle 28: Hormonkonzentrationen von Tier 3 während des Vorversuchs

Versuchs- tag	FSH [ng/mL]	LH [ng/mL]	P4 [ng/mL]	E2 [pg/mL]
-1	2,4	1,2	<0,5	22,3
1	2,5	1,1	<0,5	23,4
2	2,2	3,6	<0,5	<3,0
3	2,0	>10	0,6	<3,0
4	3,6	2,3	4,1	<3,0
5	3,0	8,9	9,9	<3,0
6	1,8	0,6	16,8	<3,0
9	3,1	0,6	27,4	<3,0
12	2,7	0,5	33,2	8,8
15	2,4	0,4	33,4	<3,0
18	2,1	2,4	2,8	5,2
19	3,0	1,0	<0,5	7,7

FSH – Follikelstimulierendes Hormon, LH – Luteinisierendes Hormon, P4 – Progesteron, E2 – 17- β -Estradiol, ng – Nanogramm, pg – Picogramm, mL – Milliliter

Tabelle 29: Hormonkonzentrationen von Tier 4 während des Vorversuchs

Versuchs- tag	FSH [ng/mL]	LH [ng/mL]	P4 [ng/mL]	E2 [pg/mL]
-3	15,8	0,8	<0,5	<3,0
-2	16,4	0,9	0,9	<3,0
-1	12,5	1,0	<0,5	8,4
1	21,3	>10	0,6	<3,0
2	12,6	3,2	0,7	<3,0
3	14,5	5,5	4,2	<3,0
4	12,5	1,7	9,9	<3,0
5	9,6	2,3	17,4	<3,0
7	16,6	2,2	27	<3,0
10	19,2	0,9	42,7	<3,0
13	15,0	0,6	54,2	<3,0
16	11,3	5,6	1,4	<3,0
17	13,6	1,8	0,9	3,2

FSH – Follikelstimulierendes Hormon, LH – Luteinisierendes Hormon, P4 – Progesteron, E2 – 17- β -Estradiol, ng – Nanogramm, pg – Picogramm, mL – Milliliter

Tabelle 30: Hormonkonzentrationen von Tier 5 während des Vorversuchs

Versuchs- tag	FSH [ng/mL]	LH [ng/mL]	P4 [ng/mL]	E2 [pg/mL]
-4	5,5	1,0	3,5	<3,0
-3	5,1	1,8	0,8	22,4
-2	4,6	2,8	<0,5	14,4
-1	5,2	2,0	0,9	13,6
1	5,2	>10	0,5	<3,0
2	5,7	>10	<0,5	<3,0
3	7,8	4,9	2,4	<3,0
6	5,9	1,3	24,6	3,7
9	6,0	0,8	44,2	7,5
12	6,2	1,6	56,2	4,2
15	6,1	>10	19,8	3,2
18	5,1	2,2	0,8	16,6

FSH – Follikelstimulierendes Hormon, LH – Luteinisierendes Hormon, P4 – Progesteron, E2 - 17- β -Estradiol, ng - Nanogramm, pg – Picogramm, mL - Milliliter

Tabelle 31: Hormonkonzentrationen von Tier 6 während des Vorversuchs

Versuchs- tag	FSH [ng/mL]	LH [ng/mL]	P4 [ng/mL]	E2 [pg/mL]
-1	<0,3	4,5	0,5	<3,0
1	1,0	4,8	<0,5	29,6
2	<0,3	>10	<0,5	5,2
3	<0,3	>10	0,7	<3,0
4	1,2	>10	3,5	<3,0
5	0,8	3,3	12,7	5,3
6	<0,3	10,0	23,1	<3,0
9	0,8	2,2	29,1	<3,0
12	3,0	4,1	44	7,6
15	1,0	2,1	64,4	<3,0
18	0,4	>10	2,5	14,5
20	0,8	3,6	0,6	<3,0

FSH – Follikelstimulierendes Hormon, LH – Luteinisierendes Hormon, P4 – Progesteron, E2 – 17- β -Estradiol, ng – Nanogramm, pg – Picogramm, mL - Milliliter

10.2 Hauptversuch

10.2.1 Einzelwerte

Gerinnungsphysiologische Untersuchungen

Tabelle 32: Gerinnungsphysiologische Parameter aus Vor- und Hauptstudie

Parameter	Kontrolle						0,1 mg/kg LNG					
	T1		T2		T3		T4		T5		T6	
	VT-16	VT34	VT-46	VT28	VT-69	VT 29	VT-72	VT26	VT-66	VT32	VT-70	VT28
TT [s]	16,8	24,3	16,8	20,6	20,6	21,5	20,5	21	22	21,2	17,3	16,7
TPT [s]	11,3	9,5	10,8	10,5	11,3	10,7	11,7	12,2	12	12,6	11,5	12,4
APTT [s]	15,5	14,5	13,4	12,7	14	12,8	15	14,6	13,8	13,9	15,3	13,5
FI [mg/100mL]	199	112	92	111	119	137	118	126	133	153	122	143

Tabelle 32 (Fortsetzung): Gerinnungsphysiologische Parameter aus Vor- und Hauptstudie

Parameter	0,02 mg/kg LNG						0,1 mg/kg LNG					
	T7		T8		T9		T10		T11		T12	
	VT -42	VT 32	VT -34	VT 30	VT -45	VT 29	VT -20	VT 30	VT -24	VT 26	VT -18	VT 32
TT [s]	16,6	20,9	18,9	20,7	17,8	19,8	17,8	24	21,1	17,8	22	22,3
TPT [s]	10,3	11,3	10,7	11,1	12,1	11,4	13	10,5	12	10,5	12,1	12,3
APTT [s]	13,7	14,1	13,1	12,8	15,1	13,5	17,5	15,4	15	14,4	13,2	14,5
FI [mg/100mL]	133	100	127	140	142	157	127	143	147	175	166	189

LNG - Levonorgestrel, T1-T12 = Tier 1 - Tier 12, VT - Versuchstag, TT - Thrombinzeit, TPT - Thromboplastinzeit, APTT - aktivierte Thromboplastinzeit, FI - Fibrinogen, s - Sekunden, mg - Milligramm, mL – Milliliter, kg - Kilogramm

Anhang

Hämatologische Untersuchungen

Rotes Blutbild

Tabelle 33: Messwerte des roten Blutbildes aus Vor- und Hauptstudie

Parameter	Kontrolle						0,002 mg/kg LNG					
	T1		T2		T3		T4		T5		T6	
	VT -16	VT 34	VT -46	VT 28	VT -69	VT 29	VT -72	VT 26	VT -66	VT 32	VT -70	VT 28
RBC [$10^{12}/L$]	10,18	10,61	6,63	6,69	7,12	7,34	9,17	8,73	9,07	7,87	9,22	7,77
HGB [mmol/L]	8,9	9,7	8,5	8,8	8,9	9,6	9,8	9,6	10,5	10,1	10,4	8,9
PCV [L/L]	0,424	0,493	0,378	0,396	0,404	0,435	0,438	0,447	0,49	0,466	0,463	0,401
MCV [fL]	41,6	46,4	57	59,2	56,7	59,3	47,8	51,2	54	59,1	50,3	51,7
MCH [fmol]	0,88	0,91	1,29	1,32	1,25	1,31	1,07	1,1	1,16	1,28	1,13	1,14
MCHC [mmol/L]	21,05	19,58	22,6	22,29	22,07	22,13	22,31	21,56	21,41	21,65	22,4	22,14
RETI [%]	3,1	1,8	0,2	0,3	0,1	0,2	0,3	0,3	0,6	1,3	0,6	0,6

Tabelle 33 (Fortsetzung): Messwerte des roten Blutbildes aus Vor- und Hauptstudie

Parameter	0,02 mg/kg LNG						0,1 mg/kg LNG					
	T7		T8		T9		T10		T11		T12	
	VT -42	VT 32	VT -34	VT 30	VT -45	VT 29	VT -20	VT 30	VT -24	VT 26	VT -18	VT 32
RBC [$10^{12}/L$]	10,06	10,06	7,78	7,5	8,73	9,02	8,2	8,42	11,48	8,59	8,62	55
HGB [mmol/L]	9,7	9,8	9,7	9,6	8,6	9,1	7,6	8	9,7	7,7	9,7	1,15
PCV [L/L]	0,453	0,489	0,433	0,441	0,401	0,426	0,347	0,384	0,473	0,372	0,454	20,93
MCV [fL]	45	48,6	55,7	58,9	45,9	47,2	42,3	45,6	41,2	43,3	52,6	1,1
MCH [fmol]	0,96	0,98	1,24	1,28	0,99	1,01	0,92	0,95	0,84	0,9	1,12	0,093
MCHC [mmol/L]	21,32	20,13	22,27	21,75	21,46	21,31	21,82	20,89	20,47	20,69	21,37	18,43
RETI [%]	0,6	2	0,9	0,9	1,1	1,1	1,2	1,2	0,7	0,5	1,7	10,77

LNG - Levonorgestrel, T1-T12 = Tier 1 - Tier 12, VT - Versuchstag, RBC - Erythrozyten, HGB - Hämoglobin, PCV – Hämatokrit, MCV - Mittleres Zellvolumen, MCH – Mittlere Hämoglobingehalt, MCHC - Mittlere Zellhämoglobinkonzentration, RETI [%] - Retikulozyten in Prozent, mmol – Millimol, L – Liter, fL – Femtoliter, fmol – Femtomol, mg - Milligramm, kg - Kilogramm

Weißes Blutbild

Tabelle 34: Messwerte des weißen Blutbildes aus Vor- und Hauptstudie

Parameter	Kontrolle						0,002 mg/kg LNG					
	T1		T2		T3		T4		T5		T6	
	VT -16	VT 34	VT -46	VT 28	VT -69	VT 29	VT -72	VT 26	VT -66	VT 32	VT -70	VT 28
WBC [10 ⁹ /L]	16,51	12,7	8,33	11,33	9,02	12,21	7,9	6,95	11,69	12,92	9,48	26,08
NEUC [10 ⁹ /L]	8,69	5,44	4	1,26	1,71	1,8	1,99	1,75	2,76	3,76	2,84	2,36
LYMC [10 ⁹ /L]	6,79	5,75	3,46	8,87	6,14	9,06	5,17	4,55	7,76	8,08	5,91	21,14
MONC [10 ⁹ /L]	0,54	0,4	0,5	0,4	0,69	0,55	0,41	0,28	0,7	0,45	0,41	0,9
EOC [10 ⁹ /L]	0,22	0,19	0,2	0,24	0,28	0,22	0,17	0,19	0,28	0,25	0,21	0,35
BASC [10 ⁹ /L]	0,05	0,18	0,07	0,43	0,04	0,36	0,04	0,06	0,05	0,25	0,05	1,05
LUCC [10 ⁹ /L]	0,22	0,11	0,11	0,12	0,16	0,22	0,13	0,13	0,13	0,12	0,07	0,28
PLT [10 ⁹ /L]	633	417	356	378	463	428	497	370	423	416	479	552

Tabelle 34 (Fortsetzung): Messwerte des weißen Blutbildes aus Vor- und Hauptstudie

Parameter	0,02 mg/kg LNG						0,1 mg/kg LNG					
	T7		T8		T9		T10		T11		T12	
	VT -42	VT 32	VT -34	VT 30	VT -45	VT 29	VT -20	VT 30	VT -24	VT 26	VT -18	VT 32
WBC [10 ⁹ /L]	13,44	15,02	11,52	6,51	7,27	10,92	7,61	9,13	13,79	12,83	16,42	18,43
NEUC [10 ⁹ /L]	4,85	9,15	2,09	3,4	2,17	5,86	2,67	3,08	3,88	6,46	3,75	10,77
LYMC [10 ⁹ /L]	7,7	5,21	8,3	2,58	4,3	4,06	3,74	5,11	8,81	5,62	11,36	6,72
MONC [10 ⁹ /L]	0,45	0,27	0,53	0,35	0,42	0,5	0,49	0,4	0,56	0,37	0,62	0,44
EOC [10 ⁹ /L]	0,19	0,15	0,2	0,1	0,22	0,36	0,36	0,23	0,26	0,18	0,32	0,24
BASC [10 ⁹ /L]	0,06	0,06	0,27	0,05	0,03	0,02	0,11	0,09	0,06	0,04	0,16	0,05
LUCC [10 ⁹ /L]	0,19	0,19	0,13	0,04	0,14	0,13	0,24	0,22	0,23	0,16	0,23	0,2
PLT [10 ⁹ /L]	544	497	390	529	269	297	284	473	587	731	558	608

LNG - Levonorgestrel, T1-T12 = Tier 1 - Tier 12, VT - Versuchstag; WBC - Leukozyten, NEUC - Neutrophile, LYMC - Lymphozyten, MONC - Monozyten, EOC - Eosinophile, BASC - Basophile, LUCC - große peroxidasenegative Zellen, PLT - Thrombozyten

Anhang

Klinisch-chemische Untersuchungen

Tabelle 35: Messwerte klinisch-chemische Parameter aus Vor- und Hauptstudie

Parameter	Kontrolle						0,002 mg/kg LNG					
	T1		T2		T3		T4		T5		T6	
	VT -16	VT 34	VT -46	VT 28	VT -69	VT 29	VT -72	VT 26	VT -66	VT 32	VT -70	VT 28
AST [U/L]	34	66	29	104	37	42	32	93	25	26	32	29
ALT [U/L]	56	60	50	57	38	41	48	56	35	41	48	45
ALP [U/L]	126	110	85	71	75	84	83	80	117	117	136	126
GGT [U/L]	48	61	68	57	77	61	60	70	58	47	60	48
CK [U/L]	838	2552	620	4006	1195	1539	249	3979	197	403	222	1125
GLU [mg/100mL]	110	133	105	85	74	68	110	89	86	86	103	82
CHOL [mg/100mL]	77	72	77	79	64	71	62	69	72	71	59	59
BUN [mg/100mL]	6	7	5	4	5	4	6	5	8	5	8	5
CREA [mg/100mL]	1,1	1,26	0,85	0,82	0,87	0,81	1,03	1,14	1,05	1,05	1,03	0,95
PHOS [mg/100mL]	8,2	7,8	7,5	6,2	8	7,2	7,5	7,8	7,2	6,9	7,1	7,2
NA [mmol/L]	149	147	143	138	143	143	140	143	146	144	142	141
K [mmol/L]	6,1	5,6	4,9	3,94	4,6	4,27	3,9	7,26	5,4	4,09	4	4,31
CA [mmol/L]	2,92	2,77	2,89	2,85	2,78	2,84	2,66	2,7	2,85	2,81	2,87	2,72
CL [mmol/L]	110	105	100	101	102	106	101	104	100	102	99	102
TP [g/100mL]	6,19	6,4	6,14	6,76	6,07	6,77	5,73	5,9	6,13	6,38	6,04	5,88

LNG - Levonorgestrel, T1-T12 = Tier 1 - Tier 12, VT - Versuchstag, AST - Aspartat-Alanintransferase, ALT - Alanin-Aminotransferase, ALP - Alkalische Phosphatase, GGT - Gamma-Glutamyltransferase, CK - Kreatinkinase, GLU - Glukose, CHOL - Cholesterin, BUN - Harnstoff Stickstoff, CREA - Kreatinin, PHOS - anorganischer Phosphor, Na - Natrium, K - Kalium, Ca - Kalzium, CL - Chlorid, TP - Totalprotein, U – Unit, L – Liter, mg – Milligramm, kg – Kilogramm, mmol – Millimol, g – Gramm, mL – Milliliter

Tabelle 35 (Fortsetzung): Messwerte klinisch-chemische Parameter aus Vor- und Hauptstudie

Parameter	0,02 mg/kg LNG						0,1 mg/kg LNG					
	T7		T8		T9		T10		T11		T12	
	VT -42	VT 32	VT -34	VT 30	VT -45	VT 29	VT -20	VT 30	VT -24	VT 26	VT -18	VT 32
AST [U/L]	75	36	24	48	25	22	28	60	26	33	31	33
ALT [U/L]	49	48	46	48	33	36	47	60	39	49	45	49
ALP [U/L]	109	94	104	80	102	74	97	64	97	84	210	120
GGT [U/L]	51	71	47	50	44	44	53	55	72	63	55	51
CK [U/L]	4689	1080	242	2234	292	206	640	2065	288	578	440	632
GLU [mg/100mL]	81	86	96	77	98	78	100	85	86	74	96	85
CHOL [mg/100mL]	62	75	84	91	71	79	79	82	78	68	99	78
BUN [mg/100mL]	6	5	6	6	6	4	8	6	6	6	7	5
CREA [mg/100mL]	0,98	1,23	0,88	1,03	10,8	0,98	0,89	0,94	1,18	1,24	0,92	0,85
PHOS [mg/100mL]	7,7	7,5	7,5	7,5	6,9	6,8	7	7	8,1	8	7,9	7,4
NA [mmol/L]	148	150	142	143	146	144	142	146	151	148	150	145
K [mmol/L]	6,7	6,26	5,2	5,32	4,7	4,45	3,9	5,1	5,8	6,3	4,4	4,2
CA [mmol/L]	2,85	2,88	2,82	2,86	2,87	2,79	2,77	2,74	3,06	2,75	2,9	2,69
CL [mmol/L]	103	104	102	101	102	105	102	100	105	102	102	97
TP [g/100mL]	5,62	6,17	5,64	6,5	5,72	6,17	6,5	7,11	6,27	6,06	6,81	6,89

LNG - Levonorgestrel, T1-T12 = Tier 1 - Tier 12, VT - Versuchstag, AST - Aspartat-Alanintransferase, ALT - Alanin-Aminotransferase, ALP - Alkalische Phosphatase, GGT - Gamma-Glutamyltransferase, CK - Kreatinkinase, GLU - Glukose, CHOL - Cholesterin, BUN - Harnstoff Stickstoff, CREA - Kreatinin, PHOS - anorganischer Phosphor, Na - Natrium, K - Kalium, Ca - Kalzium, CL - Chlorid, TP - Totalprotein, U – Unit, L – Liter, mg – Milligramm, kg – Kilogramm, mmol – Millimol, g – Gramm, mL – Milliliter

Anhang

Protein-Elektrophorese

Tabelle 36: Messwerte Proteinelektrophorese aus Vor- und Hauptstudie

Parameter	Kontrolle						0,002 mg/kg LNG					
	T1		T2		T3		T4		T5		T6	
	VT -16	VT 34	VT -46	VT 28	VT -69	VT 29	VT -72	VT 26	VT -66	VT 32	VT -70	VT 28
ALB [%]	61,8	61,3	66,1	63,9	64,7	65,3	66,1	62,7	65	64,2	64,3	62,2
TA [%]	19,4	19,2	17,8	18,4	18,3	16,7	18,3	20	17,7	17,6	19,3	19,8
TB [%]	14,2	13,6	13,1	13,8	13,3	14,1	12,5	14,2	12,6	13,3	12,7	14,6
TG [%]	4,6	5,9	3	3,9	3,7	3,9	3,1	2,9	4,7	4,9	3,7	3,4
A/G	1,62	1,58	1,95	1,77	1,83	1,88	1,95	1,7	1,86	1,79	1,8	1,65

Tabelle 36 (Fortsetzung): Messwerte Proteinelektrophorese aus Vor- und Hauptstudie

Parameter	0,02 mg/kg LNG						0,1 mg/kg LNG					
	T7		T8		T9		T10		T11		T12	
	VT -42	VT 32	VT -34	VT 30	VT -45	VT 29	VT -20	VT 30	VT -24	VT 26	VT -18	VT 32
ALB %	65,7	63,4	62,5	62,3	65,5	62,7	62,3	59,4	66,9	63,4	64,7	63,3
TA %	19,6	18,6	20,5	18,2	19,5	19	19,1	18,1	18,4	19,8	17,8	16,8
TB %	12,3	14,5	13,3	14,4	12,4	14,1	13,2	14,8	12	13,7	12,7	14,8
TG %	2,4	3,5	3,7	5,1	2,6	4,2	5,4	7,7	2,7	3,1	4,8	5,1
A/G	1,92	1,73	1,67	1,65	1,9	1,68	1,65	1,46	2,02	1,73	1,83	1,72

LNG – Levonorgestrel, T1-T12 = Tier 1 – Tier 12, VT - Versuchstag; ALB – Albumin, TA – Total- α -Globulin, TB – Total- β -Globulin, TG - Total- γ -Globulin, mg – Milligramm, kg - Kilogramm, A/G – α -Globulin / β -Globulin

Tabelle 37: Hormonkonzentrationen der Kontrollgruppe im Hauptversuch

Versuchs- tag	T1				T2				T3			
	FSH [ng/mL]	LH [ng/mL]	P4 [ng/mL]	E2 pg/mL]	FSH [ng/mL]	LH [ng/mL]	P4 [ng/mL]	E2 pg/mL]	FSH [ng/mL]	LH [ng/mL]	P4 [ng/mL]	E2 pg/mL]
-21	1,0	0,8	<0,5	44,6	1,3	0,8	1,4	7,9	1,0	1,1	0,6	<3,0
-20	1,9	6,4	<0,5	21,6	0,7	0,8	1,7	8,6	1,3	1,3	<0,5	4,1
-19	2,2	4,1	<0,5	17,2	2,0	>10,0	2,0	6,1	2,6	>10,0	<0,5	<3,0
-18	3,5	1,6	1,4	3,4	2,5	2,3	1,0	3,1	2,5	2,6	0,8	<3,0
-17	3,0	1,0	6,0	<3,0	2,2	1,2	5,7	3,5	4,1	1,0	2,8	<3,0
-16	1,6	1,3	15,4	4,8	3,0	0,4	13,9	<3,0	4,1	1,1	8,5	<3,0
-15	2,5	0,7	17,9	14,9	3,8	0,5	25,5	<3,0	2,7	1,5	14,7	<3,0
-12	2,3	0,7	35,5	3,6	2,6	0,7	45,1	<3,0	2,2	1,0	33,1	<3,0
-9	2,7	0,6	49,5	<3,0	2,1	0,3	67,6	<3,0	3,2	1,1	46,5	<3,0
-6	2,4	0,6	27,2	<3,0	2,6	0,3	68,6	3,6	3,4	1,0	61,4	<3,0
-3	1,5	1,4	<0,5	14,3	1,0	1,1	3,0	<3,0	1,6	1,3	1,6	<3,0
-2	1,2	1,0	<0,5	14,4	0,7	1,4	0,9	<3,0
-1	1,3	3,8	<0,5	25,7	0,6	0,6	1,1	5,5	0,9	1,3	0,5	<3,0
1	3,2	5,7	<0,5	5,5	0,6	0,7	2,4	8,0	1,0	1,3	1,0	6,7
2	3,8	2,0	1,7	6,2	1,6	>10,0	2,3	7,4	1,8	>10,0	0,9	<3,0
3	4,4	0,8	5,6	7,5	2,3	3,1	1,0	6,0	1,6	1,8	0,5	<3,0
4	1,6	0,6	20,8	<3,0	3,2	1,2	4,0	<3,0	3,0	1,7	4,3	<3,0
5	2,0	0,7	25,9	3,6	2,9	0,7	11,2	<3,0	3,8	1,3	13,6	<3,0

T1-T3 = Tier 1 - Tier 3, FSH - Follikelstimulierendes Hormon, LH - Luteinisierendes Hormon, P4 - Progesteron, E2 - 17- β -Estradiol, ng – Nanogramm, pg – Picogramm, mL - Milliliter, .. – keine Messwerte vorhanden

Tabelle 37 (Fortsetzung): Hormonkonzentrationen der Kontrollgruppe im Hauptversuch

Versuchs- tag	T1				T2				T3			
	FSH [ng/mL]	LH [ng/mL]	P4 [ng/mL]	E2 pg/mL]	FSH [ng/mL]	LH [ng/mL]	P4 [ng/mL]	E2 pg/mL]	FSH [ng/mL]	LH [ng/mL]	P4 [ng/mL]	E2 pg/mL]
6	2,4	0,5	20,0	<3,0
8	4,5	0,8	59,3	<3,0	2,3	1,2	32,0	<3,0
9	2,7	1,4	38,6	<3,0
11	1,8	0,9	59,5	<3,0	2,6	1,2	48,6	<3,0
12	2,9	0,5	54,7	<3,0
14	2,7	0,6	51,0	<3,0	2,2	1,3	46,1	<3,0
15	2,2	0,6	64,6	<3,0
17	1,9	0,9	1,3	5,1	2,4	1,4	5,8	<3,0
18	2,8	1,2	0,7	5,4	1,1	0,8	3,9	<3,0
19	1,6	1,1	<0,5	22,6
20	4,7	>10,0	0,5	<3,0	0,9	0,8	1,6	4,6	0,6	1,3	0,6	<3,0
21	2,5	2,1	<0,5	<3,0	0,6	0,8	0,9	7,5	0,6	1,3	<0,5	6,4
22	7	1,3	3,8	<3,0	0,6	1,8	0,8	12,0	1,9	>10,0	0,6	5,4
23	4,5	0,9	11,6	5,7	1,9	9,9	0,5	<3,0	2,5	2,2	1,3	<3,0
24	2,2	0,7	23,7	5,5	2,5	2,2	1,2	<3,0	3,1	1,6	3,1	<3,0
25	3,2	0,9	5,2	<3,0	3,3	1,4	8,3	<3,0
26	2,5	0,8	12,1	<3,0	1,7	1,3	15,6	<3,0
27	2,7	0,5	47,7	<3,0	3,1	1,2	26,5	<3,0
29	2,4	0,4	30,9	<3,0
30	4,1	0,8	54,0	3,0	3,4	1,2	38,6	<3,0
32	4,4	0,7	49,9	<3,0
33	2,9	0,7	76,1	6,7	2,7	1,2	43,2	<3,0
35	2,8	2,1	2,5	5,6	2,1	0,4	53,3	<3,0

T1-T3 = Tier 1 - Tier 3, FSH - Follikelstimulierendes Hormon, LH - Luteinisierendes Hormon, P4 - Progesteron, E2 - 17- β -Estradiol, ng – Nanogramm, pg – Picogramm, mL - Milliliter, .. – keine Messwerte vorhanden

Tabelle 38: Hormonkonzentrationen der 0,002 mg/kg/Tag LNG Dosisgruppe im Hauptversuch

Versuchstag	T4				T5				T6			
	FSH [ng/mL]	LH [ng/mL]	P4 [ng/mL]	E2 pg/mL]	FSH [ng/mL]	LH [ng/mL]	P4 [ng/mL]	E2 pg/mL]	FSH [ng/mL]	LH [ng/mL]	P4 [ng/mL]	E2 pg/mL]
-21	1,6	>10,0	1,2	5,9	0,9	1,2	1,3	<3,0	0,8	2,1	0,7	<3,0
-20	1,3	2,1	0,8	<3,0	0,9	2,1	0,9	4,6	3,3	>10,0	1,4	<3,0
-19	2,6	1,8	3,2	<3,0	3,8	2,3	1,6	<3,0	2,9	2,8	1,0	<3,0
-18	3,9	1,3	13,1	<3,0	3,3	1,3	4,3	<3,0	3,6	1,8	4,0	<3,0
-17	3,0	1,0	8,3	<3,0	3,1	1,9	9,6	<3,0
-16	2,2	1,1	10,7	<3,0
-15	2,2	1,1	43,1	<3,0	2,4	1,0	21,2	<3,0
-14	2,8	1,7	31,8	<3,0
-12	2,7	1,2	55,6	<3,0	3,1	1,0	30,9	<3,0
-11	2,9	1,3	50,4	<3,0
-9	2,2	1,3	44,3	<3,0	2,6	0,9	39,6	<3,0
-8	2,6	1,1	50,6	<3,0	2,0	1,3	57,0	<3,0
-7	2,0	1,1	50,8	<3,0
-6	2,5	1,1	46,2	<3,0
-5	1,5	2,3	6,0	<3,0
-4	1,5	1,7	2,5	<3,0
-3	1,6	1,6	1,2	3,6	1,5	1,1	2,9	<3,0
-2	0,9	1,4	1,5	19,1	0,9	1,1	2,3	<3,0	0,9	1,9	0,7	4,6
-1	1,5	>10,0	0,8	5,1	0,6	1,3	1,0	3,5	3,3	>10,0	0,8	3,6
1	1,7	2,4	1,0	<3,0	1,5	2,7	0,5	<3,0
2	3,2	2,6	3,6	<3,0	1,3	1,8	1,9	..	3,7	4,0	2,5	<3,0
3	3,0	1,4	11,0	<3,0	4,0	1,1	4,8	<3,0	3,9	1,8	8,6	<3,0
4	3,5	1,2	10,8	<3,0	6,8	2,1	16,3	<3,0
5	2,0	1,4	20,4	<3,0

T4-T6 = Tier 4 - Tier 6, FSH - Follikelstimulierendes Hormon, LH - Luteinisierendes Hormon, P4 - Progesteron, E2 - 17- β -Estradiol, ng – Nanogramm, pg – Picogramm, mL - Milliliter, .. – keine Messwerte vorhanden

Tabelle 38 (Fortsetzung): Hormonkonzentrationen der 0,002 mg/kg/Tag Dosisgruppe im Hauptversuch

Versuchs- tag	T4				T5				T6			
	FSH [ng/mL]	LH [ng/mL]	P4 [ng/mL]	E2 pg/mL]	FSH [ng/mL]	LH [ng/mL]	P4 [ng/mL]	E2 pg/mL]	FSH [ng/mL]	LH [ng/mL]	P4 [ng/mL]	E2 pg/mL]
6	2,3	1,2	29,8	<3,0
7	3,8	1,1	38,7	<3,0
8	2,2	1,3	51,9	<3,0
9	2,3	1,1	44,9	<3,0
10	2,9	1,1	43,8	<3,0
11	2,1	1,6	54,4	<3,0
12	1,9	1,4	60,8	<3,0
13	3,8	0,9	47,9	<3,0
14	2,4	1,3	56,6	<3,0
15	2,7	1,4	11,3	<3,0
16	2,8	1,6	2,6	<3,0
17	0,7	1,8	2,0	<3,0
18	0,7	1,4	1,0	5,9
19	0,6	1,8	0,9	13,8	0,6	1,2	0,8	<3,0
20	1,1	>10,0	1,3	12,3	0,6	2,9	1,0	7,5
21	2,4	2,4	1,2	<3,0	2,5	>10,0	1,2	4,0	1,9	7,1	0,5	<3,0
22	3,5	4,2	5,8	<3,0	2,3	1,5	1,4	<3,0	4,5	4,5	1,8	<3,0
23	2,7	1,3	11,7	<3,0	2,8	1,0	6,9	<3,0	3,2	1,6	5,3	<3,0
24	2,6	1,9	15,2	<3,0	2,7	1,0	11,4	<3,0	1,5	2,6	10,7	<3,0
25	2,1	1,2	25,1	<3,0	2,9	1,1	21,1	<3,0	2,3	1,8	14,7	<3,0
26	3,2	2,1	17,3	<3,0
27	4,3	1,4	28,5	<3,0
28	2,2	1,2	43,0	<3,0	3,7	1,0	48,8	<3,0
30	2,7	1,6	42,9	<3,0
31	2,0	1,2	51,1	<3,0	3,1	1,0	57,2	<3,0
33	2,5	1,8	54,0	<3,0
34	1,9	1,4	45,5	<3,0	2,9	1,0	71,4	<3,0
35	1,6	1,7	6,3	<3,0	3,5	1,2	15,6	<3,0	2,4	1,8	16,3	<3,0

T4-T6 = Tier 4 - Tier 6, FSH - Follikelstimulierendes Hormon, LH - Luteinisierendes Hormon, P4 - Progesteron, E2 - 17- β -Estradiol, ng – Nanogramm, pg – Picogramm, mL - Milliliter, .. – keine Messwerte vorhanden

Tabelle 39: Hormonkonzentrationen der 0,02 mg/kg/Tag Dosisgruppe im Hauptversuch

Versuchs- tag	T7				T8				T9			
	FSH [ng/mL]	LH [ng/mL]	P4 [ng/mL]	E2 pg/mL]	FSH [ng/mL]	LH [ng/mL]	P4 [ng/mL]	E2 pg/mL]	FSH [ng/mL]	LH [ng/mL]	P4 [ng/mL]	E2 pg/mL]
-21	0,7	1,1	1,8	7,1	0,9	0,7	0,5	5,0	0,9	1,2	0,7	<3,0
-20	2,1	1,3	1,2	6,6	1,6	>10,0	0,9	<3,0	1,1	1,6	<0,5	3,3
-19	1,6	>10,0	1,7	8,5	1,3	3,2	1,6	<3,0	2,3	2,8	0,9	<3,0
-18	1,5	3,7	1,3	<3,0	2,9	1,3	5,5	<3,0	2,4	1,6	1,7	<3,0
-17	2,6	2,1	3,6	<3,0	2,6	0,5	14,8	<3,0	3,3	1,3	7,1	<3,0
-16	5,5	1,3	7,9	<3,0	2,4	1,1	11,7	<3,0
-15	3,6	0,7	21,5	<3,0
-14	1,9	0,4	37,7	<3,0
-13	2,1	1,2	37,5	<3,0
-12	2,1	0,7	41,8	<3,0
-11	1,8	0,4	42,7	<3,0
-10	2,3	1,0	54,8	<3,0
-9	2,7	1,1	56,5	3,0
-8	1,5	0,5	57,9	<3,0
-7	2,0	0,9	50,4	<3,0
-6	7,7	0,8	57,3	<3,0
-4	1,5	1,2	2,0	<3,0
-3	1,0	1,3	3,1	4,6	1,1	0,8	2,4	<3,0
-2	1,0	1,1	1,8	6,8	1,0	0,6	1,5	5,8	0,9	1,4	1,2	<3,0
-1	0,7	0,8	1,3	7,8	0,8	>10,0	2,1	5,0	1,0	1,2	1,5	3,7
1	0,8	1,8	1,4	9,6	1,5	>10,0	0,7	<3,0	3,6	>10,0	1,0	<3,0
2	2,1	9,5	1,4	<3,0	4,0	2,3	2,6	<3,0	2,3	1,7	<0,5	<3,0
3	2,9	1,5	2,0	<3,0	4,2	2,5	5,6	<3,0	4,1	1,8	4,0	<3,0
4	5,7	1,7	5,9	<3,0	2,1	0,5	15,8	<3,0	2,8	1,1	13,7	<3,0
5	3,7	1,5	12,5	<3,0	1,3	1,1	20,4	<3,0

T7-T9 = Tier 7 – Tier 9, FSH - Follikelstimulierendes Hormon, LH - Luteinisierendes Hormon, P4 - Progesteron, E2 - 17-β-Estradiol, ng – Nanogramm, pg – Picogramm, mL - Milliliter, .. – keine Messwerte vorhanden

Tabelle 39 (Fortsetzung): Hormonkonzentrationen der 0,02 mg/kg/Tag Dosisgruppe im Hauptversuch

Versuchs- tag	T7				T8				T9			
	FSH [ng/mL]	LH [ng/mL]	P4 [ng/mL]	E2 pg/mL]	FSH [ng/mL]	LH [ng/mL]	P4 [ng/mL]	E2 pg/mL]	FSH [ng/mL]	LH [ng/mL]	P4 [ng/mL]	E2 pg/mL]
7	2,6	0,5	28,3	<3,0
8	2,6	0,6	31,0	<3,0	3,7	1,2	35,4	<3,0
10	2,8	0,6	36,9	<3,0
11	2,8	0,4	49,3	<3,0	2,9	1,2	42,4	<3,0
13	5,4	0,3	52,5	<3,0
14	2,1	0,4	49,3	<3,0	2,2	1,0	59,3	<3,0
16	1,2	0,4	2,8	<3,0	2,0	1,0	3,0	<3,0
17	1,0	0,7	3,2	<3,0
19	1,3	0,6	1,2	<3,0	1,7	0,7	0,6	<3,0	2,4	1,0	<0,5	<3,0
22	1,2	0,9	0,6	<3,0	2,6	0,6	<0,5	<3,0	1,4	1,1	0,8	<3,0
25	2,7	0,9	<0,5	<3,0	1,7	2,0	0,8	<3,0	1,7	0,9	1,0	<3,0
28	1,7	0,7	1,1	<3,0	2,4	1,2	0,7	<3,0	1,3	1,2	0,5	<3,0
31	1,6	1,4	0,5	<3,0	1,1	1,1	<0,5	<3,0	1,8	1,1	<0,5	<3,0
34	1,5	0,8	<0,5	<3,0	2,0	>10,0	<0,5	<3,0	2,1	1,4	0,6	<3,0
35	2,2	1,7	0,6	<3,0	3,1	1,1	0,7	<3,0

T7-T9 = Tier 7 – Tier 9, FSH - Follikelstimulierendes Hormon, LH - Luteinisierendes Hormon, P4 - Progesteron, E2 - 17- β -Estradiol, ng – Nanogramm, pg – Picogramm, mL - Milliliter, .. – keine Messwerte vorhanden

Tabelle 40: Hormonkonzentrationen in der 0,1 mg/kg/Tag Dosisgruppe im Hauptversuch

Versuchstag	T10				T11				T12			
	FSH [ng/mL]	LH [ng/mL]	P4 [ng/mL]	E2 pg/mL]	FSH [ng/mL]	LH [ng/mL]	P4 [ng/mL]	E2 pg/mL]	FSH [ng/mL]	LH [ng/mL]	P4 [ng/mL]	E2 pg/mL]
-21	3,0	>10,0	<0,5	12,2	2,8	3,4	0,6	20,6	1,0	1,2	<0,5	6,2
-20	1,5	1,8	<0,5	<3,0	2,0	3,0	<0,5	<3,0	1,2	>10,0	1,1	5,3
-19	3,7	1,9	2,2	3,8	2,8	1,6	1,1	<3,0	1,3	2,2	1,2	5,4
-18	4,1	1,1	8,3	4,4	6,1	2,6	5,4	<3,0	3,8	1,2	4,2	<3,0
-17	1,6	0,5	16,7	6,5	3,5	1,1	11,6	<3,0	3,6	0,6	10,1	5,2
-16	1,8	0,7	38,0	6,2	1,3	0,4	19,5	<3,0
-14	2,9	0,8	28,5	<3,0
-13	1,4	0,4	47,4	6,4	1,7	0,3	46,8	<3,0
-11	3,5	0,8	48,8	<3,0
-10	1,7	0,6	49,2	5,0	1,9	0,5	59,2	<3,0
-8	2,6	0,7	55,3	14,4
-7	1,5	0,4	48,7	3,5	2,2	0,4	74,8	<3,0
-5	3,7	1,6	2,0	<3,0
-4	1,3	1,3	0,9	12,1	1,0	1,4	3,1	3,9
-3	1,1	1,1	<0,5	3,7	1,3	1,2	<0,5	4,7
-2	1,0	0,7	<0,5	3,4	1,1	1,0	0,6	6,9	0,6	0,8	1,9	6,3
-1	1,4	0,5	1,1	7,3	1,0	1,2	<0,5	33,6	0,8	1,0	1,6	9,0
1	2,1	>10,0	0,5	9,9	4,6	>10,0	<0,5	4,5	1,3	>10,0	2,5	<3,0
2	1,8	2,9	<0,5	<3,0	1,8	1,9	1,5	<3,0	1,1	3,0	1,5	<3,0
3	4,4	1,9	5,1	<3,0	4,0	1,5	3,8	<3,0	2,8	1,3	2,9	<3,0
4	3,7	0,4	9,4	<3,0	5,3	0,9	11,0	7,5	2,5	1,4	9,9	<3,0
5	1,9	0,4	15,9	<3,0

T10-T12 = Tier 10 – Tier 12, FSH - Follikelstimulierendes Hormon, LH - Luteinisierendes Hormon, P4 - Progesteron, E2 - 17-β-Estradiol, ng – Nanogramm, pg – Picogramm, mL - Milliliter, .. – keine Messwerte vorhanden

Tabelle 40 (Fortsetzung): Hormonkonzentrationen in der 0,1 mg/kg/Tag Dosisgruppe im Hauptversuch

Versuchs- tag	T10				T11				T12			
	FSH [ng/mL]	LH [ng/mL]	P4 [ng/mL]	E2 pg/mL]	FSH [ng/mL]	LH [ng/mL]	P4 [ng/mL]	E2 pg/mL]	FSH [ng/mL]	LH [ng/mL]	P4 [ng/mL]	E2 pg/mL]
7	2,0	0,4	41,9	<3,0	3,2	1,2	38,7	<3,0
8	1,5	0,3	45,1	<3,0
10	2,5	0,7	56,0	<3,0	2,4	0,7	39,6	<3,0
11	1,6	0,4	56,5	<3,0
13	1,4	0,4	55,3	<3,0	2,1	0,5	44,5	<3,0
14	1,5	0,4	58,4	5,9
16	1,6	0,4	3,5	<3,0	1,9	0,8	3,2	4,6
17	1,3	0,4	2,6	3,1
19	2,2	0,3	1,1	<3,0	2,0	0,3	0,9	<3,0
20	1,5	<0,3	1,2	<3,0
22	2,6	0,6	<0,5	<3,0	2,1	0,4	0,5	<3,0
23	1,4	<0,3	0,7	<3,0
25	2,1	1,8	<0,5	<3,0	3,0	0,5	<0,5	<3,0
26	2,2	0,3	0,5	<3,0	1,7	0,6	<0,5	<3,0
27	2,3	0,3	0,7	<3,0
28	1,4	0,7	<0,5	<3,0	2,6	<0,3	<0,5	<3,0
29	2,4	0,6	0,6	<3,0
30	2,4	0,5	<0,5	<3,0
31	2,4	0,5	<0,5	<3,0
32	2,4	0,3	1,3	<3,0
34	3,2	0,6	<0,5	<3,0
35	2,2	0,5	<0,5	<3,0	1,4	0,3	0,8	<3,0

T10-T12 = Tier 10 – Tier 12, FSH - Follikelstimulierendes Hormon, LH - Luteinisierendes Hormon, P4 - Progesteron, E2 - 17-β-Estradiol, ng – Nanogramm, pg – Picogramm, mL - Milliliter, .. – keine Messwerte vorhanden

Tabelle 41: Wirkstoffkonzentration 24 Stunden nach der Applikation [pg/mL]

Versuchstag	0,002 mg/kg LNG			0,02 mg/kg LNG			0,1 mg/kg LNG		
	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
11	<125	<125	<125	202	125	174	527	626	1480
12	<125
13	..	<125	268	..	1000	1270	..
14	<125	445	..	439	1220
15	<125
16	..	<125	528	577	2060	2020	..
17	<125	276	1900
18	<125
19	<125	<125	..	298	273	476	2330	2230	..
20	<125	..	<125	1760
21	<125	<125	<125
22	<125	<125	..	142	287	545	2090	2570	..
23	<125	<125	<125	1900
24	<125	<125	<125
25	<125	<125	<125	373	323	617	2240	1990	..
26	<125	1940	1830
27	..	<125	1680	..
28	<125	<125	..	434	271	277	1850	2740	..
29	1420
30	<125	1460	..
31	<125	143	..	490	169	..	1830
32	<125	<125	<125	1950
33	<125	<125	<125	125
34	134	298	205	1410	1290	2060
35	266	158	720	1910	590

LNG – Levonorgestrel, T4-T12 = Tier 4 – Tier 12, pg – Picogramm, mg – Milligramm, mL – Milliliter, kg – Kilogramm, .. – keine Messwerte vorhanden

Tabelle 42: Wirkstoffspiegelprofile an Tag 10 und Tag 34 der Behandlung [pg/mL]

Versuchs- tag	Intervall [h]	0,002 mg/kg LNG			0,02 mg/kg LNG			0,1 mg/kg LNG		
		T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
10	0	<125	<125	<125	<125	<125	<125	<125	<125	226
10	4	<125	<125	<125	425	363	<125	651	680	1380
10	8	<125	<125	<125	217	304	<125	818	905	2710
10	12	<125	<125	<125	284	209	<125	720	736	1090
10	24	<125	<125	<125	202	<125	174	527	626	1480
34	0	<125	<125	<125	<125	298	205	1410	1290	2060
34	4	<125	<125	<125	580	655	598	1660	3280	4320
34	8	<125	<125	<125	336	303	333	1230	2420	3390
34	12	<125	<125	<125	282	313	239	899	2640	2080
34	24	<125	<125	<125	134	266	158	720	1910	590

Intervall [h] – Stunden nach der Applikation; LNG – Levonorgestrel, T4-T12 = Tier 4 – Tier 12, pg – Picogramm, mg – Milligramm, mL – Milliliter, kg – Kilogramm

Tabelle 43: Futterverzehr während des Hauptversuches

Versuchs- tag	Kontrolle			0,002 mg/kg LNG			0,02 mg/kg LNG			0,1 mg/kg LNG		
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
1	319	..	399	398	398	399	316	317	317
2	320	..	400	400	400	399	319	319	317
3	320	358	401	399	398	400	349	316	320	317
4	320	360	398	400	399	399	..	360	356	318	319	317
5	319	359	402	399	403	399	..	363	356	321	318	317
6	320	357	399	398	400	400	359	364	360	318	319	317
7	320	360	400	400	399	399	358	361	359	320	320	317
8	320	359	399	400	399	399	359	359	361	318	318	318
9	320	359	399	399	398	399	358	359	358	318	320	320
10	319	359	400	400	399	399	359	356	360	319	360	317
11	321	357	400	395	399	400	360	359	360	320	..	317
12	320	360	400	399	398	399	356	360	357	318	360	318
13	320	358	400	400	399	400	358	358	360	319	360	319
14	319	359	400	399	399	400	360	359	360	359	360	317
15	320	359	400	400	399	400	359	361	360	..	359	320
16	318	360	400	400	399	399	359	360	359	361	357	359
17	319	400	399	399	399	400	358	359	360	360	359	..
18	359	399	400	399	399	400	359	360	400	360	357	360
19	..	400	400	440	400	399	359	401	400	356	359	359
20	361	399	399	441	399	399	359	400	400	357	360	360
21	361	399	399	440	399	440	400	399	400	360	360	357
22	286	398	440	440	400	440	398	399	398	357	358	355
23	360	398	440	438	399	439	398	399	398	360	360	358
24	359	399	440	440	400	439	398	399	398	360	358	358
25	359	400	440	436	440	438	399	399	399	360	359	359

LNG - Levonorgestrel, T1-T12 = Tier 1- Tier 12, mg – Milligramm, kg – Kilogramm, aus technischen Gründen konnten an den mit „..“ markierten Tagen keine Futtereinwägen durchgeführt werden

Tabelle 41 (Fortsetzung): Futtermittelverzehr während des Hauptversuches

Versuchst- tag	Kontrolle			0,002 mg/kg LNG			0,02 mg/kg LNG			0,1 mg/kg LNG		
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
26	358	68	437	451	439	439	399	400	400	357	359	359
27	359	397	440	440	439	440	397	400	399	359	359	360
28	361	399	441	440	439	440	399	398	399	358	359	357
29	360	398	440	440	439	439	395	399	399	359	361	359
30	359	399	440	440	440	439	398	399	398	359	361	358
31	360	399	440	440	439	440	398	399	398	361	359	357
32	359	397	440	438	439	440	399	399	399	359	359	357
33	359	399	440	440	439	394	398	398	399	359	359	358
34	360	400	440	441	439	339	399	398	399	459	359	359
35	440	398	359	359	360

LNG - Levonorgestrel, T1-T12 = Tier 1- Tier 12, mg – Milligramm, kg – Kilogramm, aus technischen Gründen konnten an den mit „..“ markierten Tagen keine Futtereinwägen durchgeführt werden

Tabelle 44: Körpergewichte der Minischweine während des Hauptversuches

Versuchstag	Kontrolle			0,002 mg/kg LNG			0,02 mg/kg LNG			0,1 mg/kg LNG		
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
1	15	15,5	16,5	16,6	18,3	16,6	15,4	15,4	16,3	14,4	13	14
8	14,1	15,5	17	17	18,3	16,7	16,8	15,2	16,4	14,1	13	13,9
15	14,1	14,8	17,4	17,3	18,8	16,8	16,4	15,4	16,7	14,2	13,4	13,9
22	14,5	15,2	17,4	17,9	19,2	17,3	16,9	15,8	17,2	14,4	13,7	13,9
29	14,9	15,6	18,3	18,5	20	17,7	17,5	15,7	17,5	14,5	13,9	14,9
35	15,2	15,4	18,5	18,7	20	17,8	17,7	16,6	18	14,9	14,6	14,2

LNG - Levonorgestrel, T1-T12 = Tier 1 – Tier 12, mg – Milligramm, kg - Kilogramm

Tabelle 45: Körpergewichte und absolute und relative Organgewichte und Organ-/Gehirngewichte nach Entbluten

Organe		Kontrolle			0,002 mg / kg LNG			0,02 mg/kg LNG			0,1 mg/kg LNG		
		T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
Sektionsgewicht	[g]	14600	15750	17300	17800	19100	16900	17200	15600	17200	14100	13700	13500
Leber	[g]	276,57	327,60	335,81	358,53	330,09	257,57	313,69	274,61	267,72	266,70	240,28	243,45
	[%]	488,38	542,923	613,02	592,71	531,12	410,34	508,82	447,39	438,60	500,28	388,80	399,03
Niere	[g]	64,80	104,27	112,77	86,21	91,22	78,44	74,13	73,57	77,10	79,01	58,61	91,68
	[%]	114,43	172,80	205,86	142,52	146,77	124,96	120,24	119,86	126,31	148,21	94,84	150,27
Herz	[g]	52,35	66,12	71,69	69,83	81,23	69,64	72,54	70,67	80,35	63,51	65,05	65,46
	[%]	92,44	109,58	130,87	115,44	130,70	110,95	117,66	115,14	131,64	119,13	105,26	107,29
Lunge	[g]	68,19	76,53	83,88	84,81	87,21	77,16	71,82	74,77	76,19	84,82	66,19	71,65
	[%]	120,41	126,83	153,12	140,21	140,32	122,93	116,50	121,82	124,82	159,11	107,10	117,44
Speicheldrüse	[g]	11,04	15,73	9,93	12,85	11,59	9,89	11,29	11,90	13,41	11,78	10,97	9,10
	[%]	19,50	26,07	18,13	21,24	18,65	15,76	18,31	19,39	21,97	22,10	17,75	14,92
Pankreas	[g]	25,00	42,15	40,64	37,09	37,96	32,28	37,66	28,25	35,77	30,68	33,82	28,29
	[%]	44,15	69,85	74,19	61,32	61,08	51,43	61,09	46,03	58,60	57,55	54,73	46,37
Hypophyse*	[g]	0,13	0,11	0,13	0,14	0,12	0,11	0,11	0,11	0,10	0,09	0,09	0,09
	[%]	0,22	0,19	0,24	0,24	0,19	0,17	0,18	0,18	0,16	0,17	0,14	0,15
Schilddrüse	[g]	1,04	1,37	1,26	1,34	0,98	1,62	1,27	1,35	1,06	1,45	1,01	1,15
	[%]	1,84	2,27	2,30	2,22	1,58	2,58	2,06	2,20	1,74	2,72	1,63	1,89
Nebenniere	[g]	1,67	2,40	2,17	2,05	1,69	1,80	1,46	2,09	1,60	1,22	1,96	1,43
	[%]	2,95	3,98	3,96	3,39	2,72	2,87	2,37	3,41	2,62	2,29	3,17	2,34
Ovar	[g]	2,42	4,51	2,98	3,22	3,16	3,36	1,55	1,53	1,29	1,72	0,85	2,36
	[%]	4,27	7,47	5,44	5,32	5,08	5,35	2,51	2,49	2,11	3,23	1,38	3,87
Uterus	[g]	172,84	203,96	249,65	248,13	259,75	195,24	131,86	137,22	164,06	165,72	145,37	165,72
	[%]	305,21	338,02	455,73	410,20	417,94	311,04	213,89	223,56	268,78	310,86	235,23	271,63
Thymus	[g]	5,79	8,42	9,90	6,51	7,24	12,38	8,39	1,43	3,81	6,90	5,56	13,17
	[%]	10,22	13,95	18,07	10,76	11,65	19,72	13,61	2,33	6,24	12,94	9,00	21,59
Milz	[g]	36,10	54,47	34,42	35,86	43,48	37,63	35,46	34,07	33,29	29,40	30,80	48,38
	[%]	63,75	59,95	62,83	90,27	59,28	69,96	57,52	55,51	54,54	55,15	49,84	79,30
Ln. Iliacus	[g]	0,65	0,34	3,31	2,54	0,61	2,99	0,15	2,48	0,35	1,91	1,52	1,84
	[%]	1,15	0,56	6,04	4,20	0,98	4,76	0,24	4,04	0,57	3,58	2,46	3,02
Gehirn	[g]	56,63	60,34	54,78	60,49	62,15	62,77	62,77	61,65	61,38	53,31	61,80	61,01

LNG - Levonorgestrel, Ln – Lymphonodus, g - Gramm, mg – Milligramm, kg – Kilogramm, % - Organ-/Gehirngewicht, * - Organ nach der Fixation gewogen, T1-T12 - Tier 1 - Tier 12

Pathologie

Tabelle 46: Histologische Auswertung und Messergebnisse von Uterus, Cervix und Vagina

Organe			Kontrolle			0,002 mg/kg LNG			0,02 mg/kg LNG			0,1 mg/kg LNG		
			T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
Uterus														
Corpus	Kernreihen	Anzahl	1	1-2	1	1	1-2	1	1-2	1-2	1-2	2-3	2	2-3
	Kernlage	b,z,a	b	b	b,z	b,z	b,z	b,z	b,z	a	z,a	z	z,a	z,a
	Sekretgranula	+,+,+,+	+	+	+	+	++	+	+	++	++	++	++	+++
	Vakuolen	+,+,+,+	+							+	+			+
	Stiftchenzellen	+,+,+,+								++	++	+		++
	Leukozyten	+,+,+,+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	++
	Epithelhöhe, unregelmäßig	+,+,+,+								+	++	+++	++	+++
linkes Horn	Endometrium													
	Zellform	h,i	h	h	h	h	h	h	h	h-i	h	h-i	h	h
	Epithelhöhe	um	23,81	24,64	25,01	28,96	23,43	24,50	22,86	23,38	29,26	29,57	32,25	36,90
	Kernreihen	Anzahl	1	2-3	1-2	2	2	1-2	1-2	1-2	1	1-2	1-2	2-3
	Kernlage	b,z,a	b,z	b,z	b	z	b	b	b	b,z	b	b,z,a	b,z	b,z
	Sekretgranula	+,+,+,+	++	++	++	+	++	+	+	+	++	+	++	+++
	Vakuolen	+,+,+,+			+			+	+	+	+	+	+	+
	Stiftchenzellen	+,+,+,+											+	++
	Leukozyten	+,+,+,+	+	+		+	+	++	++	+	+	+	+	+
rechtes Horn	Endometrium													
	Zellform	h,i	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h
	Epithelhöhe	um	21,14	23,42	24,53	29,93	21,75	26,57	28,60	31,36	38,24	34,27	35,20	37,93
	Kernreihen	Anzahl	1	1-2	1	2	1-2	1	1-2	1-2	1-2	2-3	2	2
	Kernlage	b,z,a	b	b,z	b,z	b,z	b,z	b,z	b,z	z,a	z,a	z	z,a	z,a
	Sekretgranula	+,+,+,+	+	+	++	+	++	++	+	++	++	++	++	++
	Vakuolen	+,+,+,+					+				+			
	Stiftchenzellen	+,+,+,+								++	+++	+		++
	Leukozyten	+,+,+,+	+	+	+	+	+	+	++	+	+	++	+	+
Cervix	Epithel													
	Zellform	h,i	h	h	h	h	i	h	i	i	i	h	h	h
	Epithelhöhe	um	22,35	20,72	23,15	22,08	28,76	24,54	29,57	31,53	24,90	20,61	21,18	24,01
	Kernreihen	Anzahl	1	1	2	1	3-4	1	3-4	3-4	3-4	2-3	2	2-3
	Kernlage	b,z,a	b	b	z	b	z	b	z	z	z	b	b	b
	Sekretgranula	+,+,+,+	++	+	+	+		+				+	+	+
	Stiftchenzellen	+,+,+,+		+	+			+						+
	Leukozyten	+,+,+,+	+	+	+	+		+				++	+	+
Vagina	Epithel													
	Epithelhöhe	um	27,96	30,22	33,11	26,95	25,49	28,12	24,53	23,46	26,84	21,80	19,73	21,28
	Kernreihen	Anzahl	3-4	3-4	3-4	3-4	3-4	3	3	3	2-3	2	2	2
	Vakuolen	+,+,+,+												+
	Leukozyten	+,+,+,+		+	+			+		+	+	+	++	+

LNG - Levonorgestrel, mg – Milligramm, kg – Kilogramm, h - hochprismatisch, i - isoprismatisch, um - Mikrometer, b - basal, z - zentral, a - apikal, + - wenig, ++ - mittelgradig, +++ - hochgradig

Tabelle 47: Ergebnisse der Knochenmarksauswertung

Dosis LNG [mg/kg/Tag]	Zell- dichte	Verhältnis E/G	E		G		Lymphozyten		Plasmazellen		Retikulum- zellen	Thrombozytopoese		
			Vert.	qual.	Vert.	qual.	Vert.	qual.	Vert.	qual.		Megakaryo- zyten	Thrombo- zyten	
Kontrolle	T1	+	E	n N	n Mi	n	n	n	n	n	mk	n	- p np Rf	n
	T2	n	E	n N	n Mi	n	n	n	n	n	n	n	n p mk	n
	T3	n	G	n N	n	n	n	+	n	n	n	n	n p mk	n
0,002	T4	-	E	n	n	n	n	n	n	-	n	n	p	n
	T5	n	G	n N	n	n	n	n	n	n	n	n	n p	n
	T6	n	E	n N	n	n	n	n	n	n	n	n	n p	n
0,02	T7	n	E	n N	n	n	n	n	n	n	n	n	n p	n
	T8	+	E	n N	n	n	n	n	n	n	n	n	n p	n
	T9	n	n	n N	n	n	n	n	n	n	n	n	n p	n
0,1	T10	+	E	n N	n	n	n	+	n	n	n	n	n p mk	n
	T11	+	E	n N	n Mi	n	n	n	n	n	n	n	+ p mk	n
	T12	n	E	L N Ma	n Mi	L	n	n	n	n	n	n	+ p	n

LNG - Levonorgestrel, mg – Milligramm, kg – Kilogramm, Vert. – Verteilung, qual. - qualitativ, n - normal, L - Linksverschiebung, E - Erythrozytopoese, G - Granulozytopoese, Ma - Makroblasten, N - Normoblasten, Mi - Mitosen, p – plättchenbildende Zellen, mk - mehrkernig, + - vermehrt, - - vermindert, Rf - Reifungsdissoziation

11 Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Dr. Hermann Schweinfurth (Bayer-Schering Pharma) für die freundliche Überlassung dieses sehr interessanten Themas, die gute Betreuung der Doktorarbeit, die Bereitstellung der Kapazitäten und die sehr hilfreichen Diskussionen bedanken.

Frau Prof. Dr. Heidrun Fink danke ich für die Übernahme des 1. Gutachtens.

Bei Frau Prof. Dr. Christa Hegele-Hartung und Dr. Sybille Beier möchte ich mich für ihren persönlichen Einsatz, die hervorragende Betreuung und die sehr lehrreiche Zeit danken, Frau Prof. Dr. Christa Hegele-Hartung danke ich weiterhin für die Übernahme des 2. Gutachtens.

Frau Dr. Claudia Stark, Herrn Dr. Rainer Hofmeister und Herrn Dr. Martin Kock möchte ich für Bereitstellung der Laborkapazitäten in ihren Abteilungen danken, sowie Frau Petra Kurth, Herrn Dr. Oliver Czupalla, Herrn PD Dr. Jakob Walter, Herrn Dr. Joachim Höchel und Herrn Tivadar Buzasi für die stets sehr gute Unterstützung bei theoretischen und praktischen Fragen.

Frau Dr. Judith Reischl und ihrem Labor an der Universität Göttingen danke ich für die Messung der Hormonspiegel und die Möglichkeit, Einblicke in den praktischen Umgang mit dem Göttinger Minischwein zu bekommen.

Dem Team der Verträglichkeitsprüfung danke ich für die gute Zusammenarbeit während der Laborzeit, meinen Bürokollegen und Mitdoktoranden Dr. Gabriele-Felicitas Wöhler-Moorhoff, Oliver Lüdtker-Handjery, Jan Göbes, Claudia Neumann sowie allen umliegenden Kollegen für die gute Stimmung auf der „Spielwiese“. Daniela Kirchoff, Ulrike Gramlich, Michael Schmidt, Mirco Klein, Daniela Schlichka, Ursula Reimann und Peter Slabke, Jochen von Wedel und allen anderen danke ich für ihre moralische und praktische Hilfe und die stets ermunternden Worte.

Ein herzliches Dankeschön für die anregenden Diskussionen gilt meinen Kollegen: Dr. Florian Pühler, Dr. Jörg Frauenschuh, Dr. Ines Zurdo-Schröder, Dr. Michael Schneider, Dr. Alice Dittewig, Dr. Rudolph Beier, Dr. Jan Kunde, Dr. Sabine Gorynia, Nicola Nowak und der gesamten Doktorandenrunde der Bayer-Schering Pharma.

Der Schering AG danke ich für die Stipendien-Finanzierung meiner Promotion über 2,5 Jahre.

Dr. Daniela Rahmel, Dr. Maria Wendt, Dr. Frank Runge, Dr. Dr. Lars Mecklenburg, Regine Lohmann und Annett Mannerow danke ich für die sehr hilfreichen Diskussionen und Korrekturen bei der Fertigstellung der Arbeit.

Meinen Eltern und beiden Geschwistern danke ich für ihre stete moralische Unterstützung, ohne die dies alles nicht möglich gewesen wäre.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, Arn Tellmann, die vorliegende Arbeit selbständig und nur auf Grundlage der angegebenen Hilfsmittel und Literaturstellen verfasst zu haben.

Arn Tellmann