

⑪



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑪ CH 670 930 A5

⑤① Int. Cl. 4: A 01 K 67/00
A 61 K 37/02

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

⑫ **PATENTSCHRIFT** A5

⑲ Gesuchsnummer:	2860/86	⑦③ Inhaber:	Innofinance Altalanos Innovacios Pénzintézet, Budapest V (HU)
⑳ Anmeldungsdatum:	17.07.1986		
③① Priorität(en):	18.07.1985 HU 2763/85	⑦② Erfinder:	Gulyas, Tamas, Szekszard (HU) Banhazi, Csaba, Szekszard (HU) Graf, Zoltan, Budapest (HU) Horvath, Aniko, Budapest (HU) Kéri, György, Budapest (HU) Kovats, Eszter, Budapest (HU) Teplan, Istvan, Budapest (HU)
②④ Patent erteilt:	31.07.1989		
④⑤ Patentschrift veröffentlicht:	31.07.1989	⑦④ Vertreter:	Patentanwälte Schaad, Balass & Partner, Zürich

⑤④ **Verfahren zur Beeinflussung der Geschlechtstätigkeit von Säugetieren.**

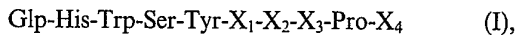
⑤⑦ Die Geschlechtstätigkeit von Säugetieren wird durch
Verabreichung einer Verbindung der allgemeinen For-
mel (I)

Glp-His-Trp-Ser-Tyr-X₁-X₂-X₃-Pro-X₄ (I)

beeinflusst. Die Symbole in der Formel (I) haben die im
Anspruch 1 angegebene Bedeutung.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Beeinflussung der Geschlechtstätigkeit von Säugetieren, dadurch gekennzeichnet, dass man die Säugetiere mit Verbindungen der allgemeinen Formel (I)



worin

X₁ für Glycylgruppe oder einen natürlichen oder synthetischen D-Aminosäurerest,

X₂ für den Rest einer als Seitenkette eine Alkylgruppe mit 1–4 Kohlenstoffatomen, eine Phenyl- oder Indolylmethylgruppe enthaltenden L-Aminosäure,

X₃ für den Rest einer als Seitenkette eine Alkylgruppe mit 1–4 Kohlenstoffatomen oder eine Carbamoylalkylgruppe mit 2–4 Kohlenstoffatomen enthaltenden L-Aminosäure und

X₄ für Glycylamidgruppe oder Alkylamidgruppe mit 1–4 Kohlenstoffatomen steht, sowie deren Salzen, behandelt, wobei Verfahren, die unter Art. 2 Bst. b PatG fallen, ausgeschlossen sind.

2. Verfahren zur Gewinnung von für die natürliche und die künstliche Befruchtung geeigneten Geschlechtsprodukten von Säugetieren im prä- und postnatalen Leben, im infantilen Alter, der Vorpupertät und im ausgewachsenen Zustand durch Regulierung der Tätigkeit ihrer Geschlechtsorgane, dadurch gekennzeichnet, dass man gemäss dem Verfahren von Anspruch 1 die Säugetiere wenigstens 1-mal, höchstens jedoch 60-mal, mit Verbindungen der allgemeinen Formel (I), sowie deren Salzen, in einer Menge von 0,01–500 µg/kg Körpergewicht behandelt und zwischen den einzelnen Behandlungen Pausen von wenigstens 2 Stunden, höchstens jedoch 7 Tagen, einhält.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass man die Säugetiere 1- bis 5-mal mit Verbindungen der allgemeinen Formel (I) behandelt.

4. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass man die Säugetiere mit einer Verbindung der allgemeinen Formel (I) in einer Menge von 1 bis 100 µg/kg behandelt.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass man zwischen den einzelnen Behandlungen Pausen von 2 bis 8 Stunden einhält.

6. Veterinärmedizinische Präparate zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1 oder 2, gekennzeichnet durch einen Gehalt an Verbindungen der allgemeinen Formel (I).

7. Verfahren zur Herstellung der Präparate gemäss Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass man Verbindungen der allgemeinen Formel (I), worin die Bedeutung von X₁, X₂, X₃ und X₄ die gleiche wie in Anspruch 1 ist, mit Träger- und/oder Hilfsstoffen vermischt und zu Arzneimittelpräparaten formuliert.

BESCHREIBUNG

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Beeinflussung der Geschlechtstätigkeit von Säugetieren gemäss Anspruch 1.

Zur Stimulierung der Geschlechtsfunktion beziehungsweise zum Induzieren der Ovulation werden in erster Linie bei Nutz- und Zuchttieren verbreitet unterschiedliche Hormonpräparate, wie zum Beispiel Steroide, Gonadotropine beziehungsweise neustens GnRH und gewisse superaktive Analoge dieses Hormons angewendet. Die gegenwärtig bekannten Substanzen beziehungsweise Verfahren induzieren

nur die Ovulation der bereits reifen, aber aus irgendeinem Grund nicht freigesetzten Eizelle beziehungsweise sind nur dazu geeignet, ein im normalen Ablauf des Zyklus vorhandenes Hemmnis durch hormonelle Wirkung für einmal, impulsartig zu beseitigen und dadurch die Ovulation zu induzieren. Gegenwärtig ist kein Hormonpräparat beziehungsweise Verfahren bekannt, welches die Funktion des Eierstockes allgemein stimuliert, den Reifungsprozess der präantralen oder der primordialen Follikel fördert beziehungsweise die Anzahl der in der Entwicklung begriffenen Follikel erhöht.

Es ist auch gegenwärtig kein Präparat beziehungsweise Verfahren bekannt, mit dessen Hilfe aus nicht geschlechtsreifen Tieren beziehungsweise aus Tieren, in denen die Entwicklung der Geschlechtsprodukte in einem bestimmten frühen Abschnitt stehengeblieben ist, oder aus intakten Tieren in vitro beziehungsweise aus Gonaden post mortem zur Befruchtung geeignete Geschlechtsprodukte hergestellt werden können.

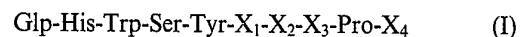
Die Funktion der Gonaden beziehungsweise die Produktion der Geschlechtsprodukte unterliegt bei zahlreichen Zuchttieren infolge ungeeigneter Haltung, bei bestimmten hochwertigen exotischen Wild- und Pelztieren infolge der nicht natürlichen Haltung einer Rückentwicklung oder bleibt stehen. Im Falle dieser Tiere haben sich die bisher bekannten Hormonpräparate im allgemeinen als wirkungslos erwiesen.

Die in der letzten Zeit bekannt gewordenen artspezifischen GnRH-Derivate (J.A. King und R.P. Millar, J. Biol. Chem. 257, 10722–28/1982; N. Sherwood u.a., Proc. Natl. Acad. Sci. 80, 2794–2798/1983) sowie die Tatsache, dass die Fachliteratur über die Gegenwart unterschiedlicher GnRH-artiger Faktoren in den Gonaden beziehungsweise Ovarien (R.M. Sharpe u.a., Nature 290, 785–787/1981; N. Dekel u.a., Biol. Reprod. 28, 161–166/1983) berichtet, werfen die Frage spezieller regulierender Faktoren und der Wechselwirkung mit diesen auf.

Die in einem eigenen älteren Schutzrecht (ungarische Patentanmeldung Nr. 4457/83) beschriebenen fisch- beziehungsweise vogelspezifischen GnRH-Derivate sind im Falle von sich im übrigen in der Gefangenschaft nicht vermehrenden Fischen geeignet, Geschlechtsprodukte zu gewinnen. Diese Wirkung beruht auf einer Stimulierung der Follikelentwicklung.

Ziel der Erfindung war die Ausarbeitung eines Verfahrens, mit dem die Tätigkeit der Geschlechtsorgane von Säugetierembryonen und Säugetieren derart stimuliert werden kann, dass zur natürlichen oder künstlichen Befruchtung geeignete Geschlechtsprodukte hergestellt und diese zur Schaffung von Nachkommen verwendet werden können. Ziel der Erfindung ist es ferner, die Geschlechtsprodukterzeugung männlicher und weiblicher Säugetiere – bezogen auf die für die Art charakteristische Lebensleistung – zu vervielfachen.

Die Erfindung beruht auf der Erkenntnis, dass durch Anwendung der Nonapeptid-(C₁–C₄-alkyl)-amide beziehungsweise Dekapeptidamide der allgemeinen Formel (I)



worin

X₁ für Glycylgruppe oder einen beliebigen natürlichen oder synthetischen D-Aminosäurerest,

X₂ für den Rest einer als Seitenkette eine Alkylgruppe mit 1–4 Kohlenstoffatomen, eine Phenyl- oder Indolylmethylgruppe enthaltenden L-Aminosäure,

X₃ für den Rest einer als Seitenkette eine Alkylgruppe mit 1–4 Kohlenstoffatomen oder eine Carbamoylalkyl-

gruppe mit 2—4 Kohlenstoffatomen enthaltenden L-Aminosäure und

X₄ für Glycylamidgruppe oder Alkylamidgruppe mit 1—4 Kohlenstoffatomen steht, sowie deren Salzen, dieses Ziel erreicht werden kann, d. h. dass mit diesen Verbindungen aus nicht geschlechtsreifen sowie in saisonalem Anöstrus oder in durch nicht natürliche Haltung bedingter Anöstrie befindlichen Säugetieren in vivo und in vitro aus intakten Tieren sowie aus Geschlechtsorganen post mortem zur natürlichen oder künstlichen Befruchtung geeignete Geschlechtsprodukte hergestellt werden können beziehungsweise deren Menge vervielfacht werden kann.

Die Herstellung der Verbindungen der allgemeinen Formel (I) ist aus der ungarischen Patentanmeldung Nr. 4458/83 sowie der US-PS 4 410 514 bekannt.

Gegenstand der Erfindung ist demnach ein Verfahren zur Beeinflussung der Geschlechtstätigkeit gemäss Anspruch 1, ein Verfahren zur Gewinnung von für die natürliche und die künstliche Befruchtung geeigneten Geschlechtsprodukten von Säugetieren im prä- und postnatalen Leben, im infantilen Alter, der Vorpuberität und im ausgewachsenen Zustand (im folgenden zusammenfassend: Medien) durch Regulierung der Tätigkeit ihrer Geschlechtsorgane und zur — bezogen auf die für die Art charakteristische Lebensleistung — Vervielfachung der Geschlechtsprodukterzeugung. Für das Verfahren ist kennzeichnend, dass man die Säugetiere wenigstens einmal, höchstens jedoch 60mal, vorzugsweise 1—5mal mit Verbindungen der allgemeinen Formel (I) in einer Menge von 0,01—500 µg/kg Körpergewicht, vorzugsweise 1—100 µg/kg Körpergewicht, behandelt und zwischen den einzelnen Behandlungen Pausen von wenigstens 2 Stunden, höchstens jedoch 7 Tagen, vorzugsweise 2—8 Stunden einhält. Die Verbindungen werden bevorzugt in Form von Lösungen, Pulvern, Injektionen oder Sprays angewendet, die Applikation kann intramuskulär, intraperitoneal, subcutan, intrauterinär usw. erfolgen. Weiterhin betrifft die Erfindung Präparate gemäss Anspruch 6 zur Durchführung der obigen Verfahren.

Bei manchen Tierarten wird durch diese Präparate die Erzeugung von Geschlechtsprodukten gesteigert, bei anderen Tieren (klinischen Fällen) wird die verminderte oder pausierende Geschlechtstätigkeit normalisiert und erreicht die für die Art typische Intensität. Das erfindungsgemässe Verfahren ist auch zur Auslösung einer Hyperproduktivität der Geschlechtsorgane und damit zur Vervielfachung der für die Art charakteristischen Menge an Geschlechtsprodukten geeignet (Superovulation).

Durch das erfindungsgemässe Verfahren wird die Funktion der Keimhaut stimuliert, und dadurch steigt die Anzahl der motilen Samenzellen im Ejakulat an.

Das erfindungsgemässe Verfahren ist ferner geeignet, eine Hyperproduktion der Hypophyse auszulösen, nach welcher die Hypophyse unempfindlich wird und dadurch ein Gleichgewichtszustand eintritt; auf diese Weise ist das Verfahren auch zur Empfängnisverhütung geeignet.

Mit dem erfindungsgemässen Verfahren können die Endprodukte unter natürlichen und unter künstlichen sowie unter laboratoriumsmässig aufrechterhaltenen Lebensbedingungen hergestellt werden.

Die beschriebenen, durch Dosierung der GnRH-Analogen in unterschiedlichem Rhythmus regulierten Formen der geschlechtlichen Funktionen sind bisher noch nicht vorbeschriebene, neue Erscheinungen.

Die Hauptvorteile des erfindungsgemässen Verfahrens bzw. Präparates können wie folgt zusammengefasst werden.

a) Durch Anwendung des Präparates kann die Gonaden-tätigkeit von unter nicht natürlichen Bedingungen gehaltenen Säugetieren verbessert beziehungsweise die normale

Funktion wiederhergestellt werden, die Tiere werden zur Erzeugung von Nachkommen geeignet gemacht.

b) Mit dem Verfahren kann eine Hyperproduktion der Eierstöcke induziert werden, wodurch bezogen auf die für die jeweilige Art charakteristische Anzahl der Ovulationen ein Mehrfaches an Eizellen gewonnen werden kann. Diese können nach einer in vitro Befruchtung in Form von Embryos aufbewahrt oder von als Empfänger fungierenden Tieren ausgetragen werden.

c) Mit dem Verfahren kann in infantilen Exemplaren von Säugetieren eine Hyperstimulierung der Gonaden und dadurch eine Superovulation induziert werden. Auf diese Weise können von einem Medium schon zu einem Zeitpunkt Nachkommen gewonnen werden, an dem das Medium selbst noch nicht geschlechtsreif ist.

d) Das Verfahren ist unter speziellen Laborbedingungen, in Organkulturen, geeignet zur Herstellung von in vitro befruchtbaren Eizellen aus intakten Eierstöcken post mortem. Auf diese Weise können aus hochwertigen Zuchttieren auch nach dem Tode des Mediums Nachkommen gewonnen werden.

e) Der Vertrieb der mit dem Verfahren hergestellten Geschlechtsprodukte ermöglicht die durch die Entfernung zwischen den grossen Erdteilen gehinderte Hybridisation der Arten, und dadurch ist die Möglichkeit zur Züchtung neuer Nutztierarten gegeben.

f) Mit dem Verfahren können unter industriemässigen Produktionsbedingungen aus beliebigen Altersgruppen männlicher und weiblicher Säugetiere grosse Mengen an Eizellen, Samen oder Embryos hergestellt werden, was zum Beispiel die Schaffung von Embryobanken und den interkontinentalen Vertrieb der Nachkommen ermöglicht.

g) Mit dem Verfahren kann der saisonbedingte Anöstrus und die gehemmte Spermatogenese von Säugetieren aufgehoben werden. Dadurch sind zu jedem Zeitpunkt Nachkommen erzeugbar, was zu einer besseren Nutzung der wirtschaftlichen Objekte führt.

h) Das Verfahren ist zur künstlichen Vermehrung von unter Naturschutz stehenden seltenen Arten geeignet.

i) Mit dem Verfahren kann sowohl in männlichen wie auch in weiblichen Säugetieren die Hypophyse unempfindlich gemacht werden, und dadurch kann eine unerwünschte Trächtigkeit auch in Fällen vermieden werden, in denen die bekannten Empfängnisverhütungsmittel nicht anwendbar sind.

Die Erfindung wird an Hand der folgenden Ausführungsbeispiele näher erläutert.

Beispiel 1

50 Auslösung einer Superovulation in infantilen weiblichen Ratten

60 Stück 21 Tage alte, infantile weibliche Ratten von 7—8 g Gewicht wurden intraperitoneal mit in physiologischer Kochsalzlösung gelöstem D-Phe⁶,Gln⁸-GnRH behandelt. Abhängend von der Art der Behandlung wurden die Tiere in mehrere Gruppen eingeteilt. In der zwischen einem Tag und 8 Tagen dauernden Behandlungsreihe wurden Vordosen von 1 beziehungsweise 2 µg pro Tag beziehungsweise zweimal pro Tag verabreicht.

60 Nach Beendigung der Behandlungen wurden sämtliche Tiere mit Ätherdampf getötet, und ihre Eierstöcke wurden nach Eintritt des Todes, 24 Stunden nach der letzten Behandlung herausoperiert. Die Auswertung erfolgte visuell und an Hand histologischer Proben. In den Eierstöcken der Kontrolltiere wurden mehrere in der Entwicklung befindliche Follikel gefunden, aber keines erreichte die Grösse Graaf'scher Follikel, auch waren weder Gelbkörper noch Corpus haemorrhagicum vorhanden. Demgegenüber konnte

bei allen behandelten Gruppen Hormonwirkung nachgewiesen werden, die sich im Wachstum der Follikel, der Umbildung zu Grafschen Follikeln, der Ovulation grosser Follikel und der Herausbildung normaler Gelbkörper manifestierte. Auch Eileiter und Gebärmutter waren vergrössert. Von den 60 behandelten Tieren zeigten insgesamt 4 keine Reaktion auf die Behandlung. Bei den Tieren, die 4 Tage lang täglich zweimal 2 µg GnRH-Analog erhalten hatten und am 4. Tag 6 Stunden nach der 2 µg-Dosis mit einer Dosis von 10 µg behandelt worden waren, befanden sich in den Eierstöcken unmittelbar vor der Ovulation stehende, weich gewordene Grafsche Follikel in grosser Menge. Die Anzahl der endgültig reifen Grafschen Follikel pro Tier lag zwischen 60 und 90, während im Falle ausgewachsener Tiere der Normalwert bei 12 liegt. Eine zweite Gruppe der Tiere wurde auf die gleiche Weise behandelt mit dem Unterschied, dass sich die Behandlung über 6 Tage erstreckte. Im Falle dieser Gruppe wurde die Superovulationsleistung nach der Anzahl der in den Eierstöcken entstandenen normalen Gelbkörper bewertet. Ähnlich wie im Falle der weiter oben ausführlich beschriebenen Ergebnisse war die Anzahl der Gelbkörper pro Tier auch hier zwischen 60 und 90. Die histologische Auswertung bestätigte dieses Ergebnis in vollem Masse.

Auf die beschriebene Weise wurden einesteiis bereits in noch infantilen Exemplaren der Art reife Eizellen hergestellt, zum anderen wurde die Anzahl der Eizellen verglichen mit dem physiologischen Wert der erwachsenen Tiere vervielfacht.

Beispiel 2

Auslösung einer Superovulation an infantilen weiblichen Mäusen

Auf die im Beispiel 1 beschriebene Weise wurden insgesamt 105 weibliche Mäuse behandelt, die 28 Tage alt waren und ein Gewicht von 5–6 g aufwiesen. Die 1–8 Tage lang behandelten Tiere bekamen täglich zweimal 1–5 µg D-Phe⁶,Gln⁸,desGly¹⁰-GnRH-äthylamid. Zwischen den einzelnen Behandlungen lag eine Zeit von 4 Stunden. Die Eierstöcke wurden 27 Stunden nach der letzten Injektion entfernt.

Die Eierstöcke der Kontrollgruppe waren von mattgelber Farbe und homogener Struktur, in manchen Eierstöcken befanden sich 1–2 wachsende Follikel. In den Gruppen der behandelten Tiere konnte an allen Eierstöcken, vergrösserten Eileitern und der Gebärmutter die Wirkung des Hormons beobachtet werden. Bei den Tieren, die täglich einmal eine Dosis von 1 µg und am 3. Tag vier Stunden nach der 1 µg-Dosis 5 µg des genannten GnRH-Analogs erhalten hatten, waren in den Eierstöcken endgültig ausgereifte, sich wenig anfühlende Grafsche Follikel zu finden, und zwar pro Tier 45–70 Stück. Bei einer ähnlich, aber 5 Tage lang behandelten Gruppe hatten sich an der Stelle der Grafschen Follikel normale Gelbkörper in der genannten Anzahl gebildet. Das Ergebnis der histologischen Untersuchung stimmte mit dem der visuellen Auswertung überein.

Die Ergebnisse bestätigten die Ergebnisse des Verfahrens gemäss Beispiel 1.

Beispiel 3

Auslösung einer Superovulation an infantilen Kaninchen
20 unter den Bedingungen der Massenhaltung geborene junge Kaninchen der Rasse «Weisse Perle» im Alter von 42 Tagen wurden drei Tage lang täglich zweimal intraperitoneal mit je 5 µg D-Phe⁶,Gln⁸-GnRH behandelt. Dann wurden die Tiere in zwei Gruppen eingeteilt. Die eine Gruppe wurde am 4. Tag mit 50 µg Wirkstoff behandelt, die andere Gruppe mittels Ätherdampf getötet. Die Anzahl der reifen Grafschen Follikel in der vor der Behandlung getöteten Gruppe

diente als Kontrolle bei der Feststellung der durch die Dosis von 50 µg eintretenden Veränderung. Bei den am Leben gelassenen Tieren wurde der Eintritt der Ovulation an zwei Tieren durch eine 10 Stunden lang dauernde, unter Narkose vorgenommene laparoskopische Untersuchung (Spiegelung der Bauchhöhle) verfolgt. Die Behandlung mit 50 µg hatte nach 26 Stunden pro Tier 30–45 Ovulationen beziehungsweise Corpus haemorrhagicum zur Folge, während die Eierstöcke der Kontrolltiere inaktiv waren.

Mit diesem Verfahren konnten bereits aus infantilen Exemplaren von Kaninchen reife Eizellen hergestellt und deren Anzahl bezogen auf den physiologischen Wert vervielfacht werden.

Beispiel 4

Auslösung einer Superovulation an infantilen Schweinen
20 infantile weibliche Ferkel, die 100 Tage alt waren, wurden 6 Tage lang täglich zweimal intramuskulär mit je 10 µg D-Phe⁶,Gln⁸-GnRH behandelt. Zur Auswertung wurde aus den Kontrolltieren je ein Eierstock entfernt, die Untersuchungsmethoden entsprachen den in Beispiel 3 beschriebenen, die Anzahl der gebildeten Grafschen Follikel und die Anzahl der nach der Ovulation gebildeten Gelbkörper wurde verglichen. Der Eintritt der Ovulation wurde mit dem Laparoskop beobachtet. Die am 7. Tag verabfolgte Dosis von 100 µg D-Phe⁶,Gln⁸-GnRH hatte nach 41 Stunden an den 10 behandelten Ferkeln 15–36 Ovulationen zur Folge. Die Behandlung der infantilen Ferkel führte zu dem gleichen Ergebnis wie im Falle der in den Beispielen 1–3 genannten Tierarten.

Beispiel 5

Auslösung einer Superovulation an infantilen Schafen
10 Jerke-Lämmer, die 50 Tage alt waren, wurden 5 Tage lang täglich zweimal mit 10 µg D-Phe⁶,Gln⁸,desGly¹⁰-GnRH-äthylamid intramuskulär behandelt. Eine am 6. Tag verabreichte Dosis von 70 µg Wirkstoff hatte pro Tier 3–9 Ovulationen zur Folge. Bei den Kontrolltieren trat keine Veränderung ein. Die Auswertung erfolgte sowohl bei den behandelten Tieren wie auch bei der Kontrolle mittels Laparoskopie. Die Ergebnisse stimmten mit den in den Beispielen 1–3 beschriebenen überein.

Beispiel 6

Auslösung einer Superovulation an infantilen Rindern
8 infantile Kälber, die 65 Tage alt waren, wurden 8 Tage lang täglich dreimal mit 2 µg D-Phe⁶,Gln⁸,desGly¹⁰-GnRH-äthylamid behandelt. Nach einem Tag Pause, am 10. Tag wurden den Tieren intramuskulär 100 µg Wirkstoff appliziert. Nach der letzten Injektion wurden beide Eierstöcke entnommen; im allgemeinen wurden pro Eierstock etwa 5–11 entwickelte Grafsche Follikel gefunden. Die Hälfte der Follikel fühlte sich nicht mehr hart an, stand demnach unmittelbar vor der Ovulation.

Dieses Experiment beweist, dass auch im Falle von Rindern schon aus infantilen Tieren mehrere reife Eizellen gewonnen werden können, während das erwachsene Rind normalerweise nur eine Eizelle ovuliert.

Beispiel 7

Behandlung physiologischer Oligospermie bei Schimpansen zwecks Erzielung von Normospermie
Für in kleinen Gruppen lebende Tierarten, insbesondere jedoch für die Primaten ist die in der Fachliteratur mehrfach publizierte Tatsache charakteristisch, dass zwar alle Männchen in der Horde eine aktive Libido haben, aber nur die Leittiere kopulieren, während die untergeordneten Männchen physiologisch und reversibel oligospermisch sind. Im

vorliegenden Fall wurde ausser dem vom Leittier gesammelten und in der Spermbank gelagerten Sperma ausgesprochen zum Zwecke der Insemination noch das Sperma der subordinierten 4 Männchen (alle geschlechtsreif) benötigt. Vor der Behandlung wurden die Tiere unter Narkose auf elektrischem Wege zur Ejakulation gebracht. Die Ejakulate wurden unter dem Mikroskop nach Dichte und Motilität bewertet und dann einer Tiefkühlprobe (-196°C) unterzogen. Eigene frühere spermatologische Untersuchungen hatten nämlich gezeigt, dass mikroskopisch schlecht erfassbare defekte Samenzellen die Tiefkühlung nicht überleben. Das nach der Tiefkühlung erhaltene günstige Spermaabild zeigte, dass die Spermiogenese normal abläuft. Das vor der Behandlung von den untersuchten Männchen genommene Ejakulat zeigte physiologische Oligospermie. Danach erhielten die 60–90 kg schweren Schimpansen wöchentlich einmal $100\text{ }\mu\text{g D-Phe}^6\text{,Gln}^8\text{,desGly}^{10}\text{-GnRH-äthylamid}$ in 1 ml physiologischer Kochsalzlösung. Die Applikation erfolgte intramuskulär mit einem Pressluftschießgerät. In den Ejakulaten, die in der 4. Woche nach der ersten Behandlung unter Narkose, auf elektrischem Wege gewonnen wurden, konnte ein Anteil von 40–60% Spermium-Vorformen registriert werden, deren Motilität nach der Tiefkühlprobe unter 10% lag. In den Ejakulaten, die 60 Tage nach der ersten Behandlung gewonnen wurden, war der Anteil der defekten Samenzellen geringer als 30%, und die Motilität überstieg 60%. Quantitative und qualitative Eigenschaften der Ejakulate stimmten mit denen des vom Leittier gewonnenen sowie mit den Angaben der Fachliteratur überein. Beim Tiefkühlen der im Verhältnis 1:1 verdünnten Ejakulate sank die 60%ige Motilität nur auf 45%. Sperma dieser Qualität ist sowohl frisch wie auch tiefgeköhlt für Inseminationszwecke geeignet.

Auf die beschriebene Weise kann aus subordinierten Männchen zur Befruchtung geeignetes, in der Spermbank lagerbares Sperma geeigneter Menge und Qualität gewonnen werden.

Beispiel 8

Auslösung der Spermiogenese bei einem saisonbedingt oligospermischen Wisentstier zum Zwecke der Gewinnung von zur Insemination und zur Tiefkühlagerung geeignetem Ejakulat

Von einem im Besitz des zoologischen Gartens befindlichen, etwa 700 kg schweren Wisentstier wurde um Monat Mai unter Narkose, auf elektrischem Wege eine Samenprobe genommen. Es wurde festgestellt, dass der Stier sich im Zustand saisonbedingter Oligospermie befand. Die Symptome waren folgende: im Gesichtsfeld des zur Spermauntersuchung im allgemeinen benützten, 1500fach vergrößernden Mikroskopes war die Spermiumzahl 5–20, der Anteil der defekten Samenzellen betrug 75–80% und die Dichte des Spermas 0,5. Sperma dieser Qualität ist zur Befruchtung ungeeignet.

Das Tier wurde nun intramuskulär (mittels eines Pressluftschießgerätes) wöchentlich zweimal mit je $200\text{ }\mu\text{g D-Phe}^6\text{,Gln}^8\text{-GnRH}$ behandelt. Am 55. Tag nach Beginn der Behandlung wurde das Tier zweimal, mit einer Stunde Zeit dazwischen, zur Ejakulation gebracht. Die beiden Ejakulate wurden vereinigt; die Dichte betrug 4, die Motilität 55%. Das Sperma wurde tiefgeköhlt und dann die durch das Tiefkühlen eingetretene Motilitätsverminderung bestimmt. Diese betrug nur 5%.

Mit diesem Verfahren gelang es, die Spermiogenese des Zuchtieres so zu beeinflussen, dass statt des zur Befruchtung nicht verwendbaren Ejakulats ein sowohl im frischen Zustand wie auch nach einer Tiefkühlagerung zur Befruch-

tung mehrerer Kühe (insgesamt 14) geeignetes Sperma sehr guter Qualität gewonnen werden konnte.

Beispiel 9

Auslösung der Spermiogenese bei saisonbedingt oligospermischen Rotfüchsen (*Vulpes vulpes*)

Die Spermiogenese von im Tierpark gehaltenen, saisonbedingt oligospermischen Rotfüchsen sollte zu dem Zweck beeinflusst werden, dass die in Zuchtstationen gehaltenen Edelsilber- und Blaufüchse inseminiert werden können, um besondere und hochwertige Hybridfelle herstellen zu können. Aus der Fachliteratur ist bekannt, dass sämtliche Unterarten der Füchse nur einmal im Jahr läufig sind und ausserhalb dieser einen Periode die Gonaden beider Geschlechter völlig inaktiv sind. Zwischen dem Östrus der einzelnen Unterarten besteht eine zeitliche Differenz von mehreren Monaten (Rotfuchs: Januar, Blaufuchs: April bis Mai). Die Ergebnisse der Untersuchungen wurden mit dem Spermaabild einer im saisonalen Östrus befindlichen Population verglichen, bei der die durchschnittliche Ejakulatmenge 2 ml, die Dichte 3 und die Motilität 50–60% betrug. Dies wurde als physiologischer Wert betrachtet.

Fünf geschlechtsreife männliche Rotfüchse von durchschnittlich 8 kg Gewicht wurden beginnend im April sieben Wochen lang wöchentlich zweimal mit $1, 5, 10, 50\text{ }\mu\text{g D-Phe}^6\text{,Gln}^8\text{-GnRH}$ behandelt. In der 3. Woche nach Beginn der Behandlung wurden Spermaproben genommen. In den Proben betrug die Anzahl der Samenzellen etwa 60–70% des physiologischen Wertes, die Anzahl der degenerierten Spermien überstieg 40%. Die defekten Formen waren zum überwiegenden Teil Jungformen (Plasmotropfen am Mittelteil des Halsteiles). In der 7. Woche nach Beginn der Behandlung wurde unter Narkose erneut Ejakulat gesammelt. Von sämtlichen Tieren konnte erfolgreich Samen genommen werden, das Volumen des Ejakulats betrug zwischen 1,2 ml und 3,1 ml, die Dichte lag bei 3, die Motilität 65%, überstieg numerisch den physiologischen Wert wesentlich. (Die männlichen Tiere waren in dieser Zeit von den weiblichen getrennt, zu einer Entleerung durch Kopulation bestand keine Möglichkeit.) Die Spermaproben wurden nach Qualität in Gruppen eingeteilt und tiefgeköhlt. Nach dem Verdünnen und Tiefkühlen und schliesslich dem Auftauen war die Motilität des auf -196°C gekühlten Spermas 45%. Unter Verwendung des tiefgeköhlten Spermas konnte – unter Anwendung der GnRH-Programmierung (s. Beispiel 17) und der Inseminationstechnik – bei Blaufüchsen eine normale Trächtigkeit erreicht werden.

Durch bei den fünf Füchsen vorgenommene einmalige Ejakulatabnahme konnten 56 Dosen zur Befruchtung geeigneten Spermas hergestellt werden. Die Technik ist zur Herstellung von Hybridedelfellen in Grossfarmen geeignet.

Beispiel 10

Behandlung eines wegen degenerierten Spermaabildes infertilen sibirischen Tigers

Ein im Besitz des zoologischen Gartens befindlicher, 8 Jahre alter sibirischer Tiger von 120 kg Gewicht lebte seit drei Jahren mit einer Tigerin zusammen. Im Östrus des Weibchens fanden regelmässig Paarungen statt, aber Nachwuchs stellte sich nie ein. Dass eine Trächtigkeit durch Schuld des Weibchens nicht zu Stande kam, musste ausgeschlossen werden, weil die Tigerkatze früher von einem anderen Männchen schon trüchtig gewesen war und ihre Jungen auch aufgezogen hatte.

Von dem Tiger männchen wurde unter Narkose, auf elektrischem Wege eine Spermaprobe genommen. Das Ejakulat war sehr dünn, pro Gesichtsfeld waren 4–5 degenerierte Spermien sichtbar, die eine zitternde Bewegung vollführten.

Die Form der Degenerationen war für die jüngeren Phasen der Spermatogenese charakteristisch. Das Tier wurde wöchentlich einmal intramuskulär (mittels eines Pressluftgeschossgerätes) mit 100 µg D-Phe⁶, Trp⁷, Leu⁸-GnRH, gelöst in 1 ml physiologischer Kochsalzlösung, behandelt. Der Tiger wurde zusammen mit seiner Tigerin gehalten, und auch während der Zeitdauer der Behandlung fanden regelmässig Paarungen statt. Das Weibchen wurde trächtig und gebar drei gesunde kleine Tiger. Aus dem Zeitpunkt der Geburt kann geschlossen werden, dass die fertile Kopulation 40–50 Tage nach der ersten Behandlung stattfand.

Das erfindungsgemässe Präparat ist demnach zur Behandlung des degenerierten Spermiabildes infertiler männlicher Tiger und auf diese Weise zur Erzielung von Nachwuchs geeignet.

Beispiel 11

Stimulierung physiologischer Normospermie an einem bengalischen Tiger zur Erzielung von die Tiefkühlung ermöglichender Hyperspermie

Ein im Besitz des zoologischen Gartens befindlicher, 8 Jahre alter bengalischer Tiger von etwa 200 kg Gewicht paarte sich regelmässig, sein Weibchen war früher in jedem Jahr trächtig gewesen. In Kenntnis dessen wurde von dem Tiger unter Narkose, auf elektrischem Wege in der Paarungszeit eine Spermaprobe genommen. Es wurde festgestellt, dass die Dichte des Spermas 3, die Motilität 30% und die Menge des Ejakulats 0,2 ml betrug. Das Ejakulat zeigte das Bild physiologischer Normospermie. Eine derart geringe Menge Ejakulat kann aus technischen Gründen nicht tiefgefroren werden. Um eine Leberschädigung zu vermeiden, darf die Narkose höchstens aller 4 Tage vorgenommen und höchstens 4–5 Stunden lang aufrechterhalten werden. Diese Art des Spermasammelns ist nicht durchführbar.

Das Männchen wurde in einen getrennten Käfig gesperrt und 12 Tage lang täglich mit 10 µg D-Phe⁶, Gln⁸, desGly¹⁰-GnRH-äthylamid behandelt. Der Wirkstoff wurde in 1 ml physiologischer Kochsalzlösung gelöst und mittels eines Pressluftgeschossgerätes intramuskulär appliziert. Am 12. Tag wurde das Tier unter Narkose, auf elektrischem Wege zweimal, mit einer Stunde Zeit dazwischen, zur Ejakulation gebracht, dabei wurden 1 ml beziehungsweise 0,8 ml Sperma gewonnen. Die Dichte der vereinigten Proben betrug 4, die Motilität lag bei 70%. Die Spermaproben wurden tiefgekühlt und in 21 Einzeldosen zur künstlichen Befruchtung aufgeteilt. Nach dem Auftauen des Spermas betrug die Motilität 60%.

Auf diese Weise konnte von einem bengalischen Tiger in einer Spermaabank lagerbares Sperma in bedeutender Menge gewonnen werden.

Beispiel 12

Behandlung einer durch nicht natürliche Haltung verursachten Aspermie an einem Orang-Utan

Ein im Besitz des zoologischen Gartens befindlicher, 18 Jahre alter männlicher Orang-Utan von etwa 350 kg Gewicht war als Jungtier eingefangen worden. Er hatte nacheinander drei Eigentümer gehabt. Der Anamnese nach hatte er nie eine Gefährtin gehabt, sondern war immer allein gehalten worden und hatte sich nie gepaart. Im Zoo lebte er seit 11 Jahren, ohne Artgenossen und ohne Weibchen. Sein Betragen war phlegmatisch, inaktiv, von Hospitalisationssymptomen gekennzeichnet. Der zoologische Garten bekam ein Angebot, demzufolge eine Institution das Tier kaufen würde, wenn es zu der Borneo-Unterart gehört und fertil ist. Die Chromosomenuntersuchung wies aus, dass das Tier zu der Borneo-Unterart gehört, d. h. ein ausserordentlich seltenes Exemplar ist (auf der ganzen Welt gibt es 153 Exemplare).

re). In der Anamnese stellte es die Fertilität in Frage, dass die für die männlichen Primaten charakteristische Aggressivität und das regelmässige Masturbieren seit der Zeit der vor etwa 5–6 Jahren entstandenen Hospitalisation völlig aufgehört hatten. Von dem Tier wurde unter Narkose, auf elektrischem Wege eine Spermaprobe genommen. In das Ejakulat war ausschliesslich die Ausscheidung der Nebendrüsen entleert worden, dreimal je ein Tropfen, insgesamt 0,1 ml. Im Ejakulat konnten keine beweglichen Spermien gefunden werden, lediglich einige inaktive Samenzellen waren vorhanden. (Bei der mikroskopischen Untersuchung wurden in 10 Gesichtsfeldern insgesamt 1–2 Stück gezählt.)

Das Tier wurde nun wöchentlich zweimal mit 100 µg D-Phe⁶, Gln⁸, desGly¹⁰-GnRH-äthylamid behandelt. Die Behandlung erfolgte auf die in den Beispielen 1–11 beschriebene Weise. Während der Zeitdauer der Behandlung wurden die Bewegungen des Tieres lebhafter, aktiver, aber das konnte nicht als Anstieg der Libido gewertet werden, denn es konnte auch von der Angst vor den Einschiessinjektionen ausgelöst sein. Die Behandlung wurde am 47. Tag nach der ersten Injektion beendet. Das Tier wurde in erneuter Narkose zweimal, mit einer Stunde Zeit dazwischen, zur Ejakulation gebracht, wodurch insgesamt 3,2 ml Sperma gewonnen wurden. Die Dichte des Spermas betrug 3, die Motilität war 35%. Der Anteil der degenerierten Samenzellen betrug 20%, praktisch handelte es sich nur um junge Entwicklungsformen (Plasmotropfen am Mittelteil des Halsteils).

Wegen des ausserordentlich hohen Wertes des Tieres und auch im Interesse der Unversehrtheit des die Behandlungen vornehmenden Personals wurde die Behandlung nicht weiter fortgesetzt. Den Käufer befriedigte das kontrollierte Spermiabild, das den für fertile Primaten charakteristischen Werten entsprach.

Auf diese Weise konnte die Fertilität eines ausserordentlich seltenen, wertvollen Tieres wiederhergestellt und durch Aufbewahrung seines Spermas eine im internationalen Katalog verzeichnete Genreserve gebildet werden.

Beispiel 13

Ovariale Hemmung an Löwen zum Zwecke der Kontrazeption

In den Tiergärten der ganzen Welt wird unter den grossen Raubtieren der Löwe gezeigt. Für die unterschiedlichen Panoramen und Safari-Parks ist es erforderlich, beide Geschlechter gleichzeitig, in ein und demselben Lebensraum zu zeigen. Unter den grossen Raubtieren ist der Löwe das einzige, das sich in Gefangenschaft bei zureichenden Ernährungsverhältnissen gut vermehrt. Wegen der absoluten Sättigung des «Löwenmarktes» ist die Ausarbeitung eines empfängnisverhütenden Verfahrens wünschenswert, das für das Tier ungefährlich ist, in seiner äusseren Erscheinung und seinem Verhalten keine Veränderung hervorruft und trotz fertiler Kopulation die Empfängnis verhütet. Die Empfängnisverhütung auf der Basis von Sexualsteroiden führt innerhalb kurzer Zeit zu krankhafter Verfettung und dem Verlust des Demonstrationswertes des Tieres.

Eine im Besitz des zoologischen Gartens befindliche intakte, fruchtbare Löwin von etwa 200 kg Gewicht, die in ihrem Leben schon fünfmal geworfen hatte, wurde alle drei Wochen zweimal mit D-Phe⁶, Gln⁸-GnRH behandelt, und zwar zuerst mit 50 µg, nach 4 Stunden mit 500 µg, und dann wurde eine Pause von drei Wochen eingehalten. Diese alle drei Wochen stattfindende Behandlung wurde vom Beginn des Östrus bis zum 50. Tag nach dem für die Art charakteristischen Endzeitpunkt des Östrus (also vom April bis zum August) vorgenommen. Das Tier zeigte normales Verhalten und paarte sich während des Östrus regelmässig, das betreffende Männchen war gemäss der Untersuchung normos-

perm. Die Löwin wurde während der Zeit der Behandlung nicht trächtig, und weder in ihrem Verhalten noch in ihrem Aussehen waren Abweichungen vom Normalen zu beobachten.

Beispiel 14

Induzierung der Geschlechtstätigkeit von unter den Bedingungen der Massenhaltung in der Pubertät befindlichen weiblichen Läufern zum Zweck der erstmaligen Auslösung des empfängnisbereiten Zustandes

Unter den Bedingungen der Massenhaltung wird angestrebt, die zur Aufrechterhaltung des Bestandes vorgesehenen Zuchttiere so bald wie möglich für die Zucht einzusetzen sowie die Befruchtung und das Abferkeln im Interesse der Anpassung an eine kontinuierliche Technologie zu synchronisieren. Die gonade Aktivität von in grosser Masse gehaltenen, durch intensive Fütterung zu schnellem Wachstum gezwungenen weiblichen Läufern ist in der Zeit der Präpubertät und der Pubertät labil, deshalb kommt es selten und über die gesamte Population verstreut vor, dass der an sich empfängnisbereite Zustand später von einer Trächtigkeit gefolgt ist.

Für die Zwecke des Versuches wurden in einer Schweineaufzuchtstation von den zur Verfügung stehenden 200 zukünftigen Zuchtsauen — auf Grund der besten Entwicklung, der besten Futterverwertungsfähigkeit usw. — 60 Tiere ausgesucht. Diese wurden zufallsartig in 2 Gruppen zu je 30 Tieren eingeteilt. Beide Gruppen wurden, ebenfalls der Technologie auf dieser Station entsprechend, 24 Stunden lang weder gefüttert noch getränkt. Die Tiere wurden zum Zeitpunkt ihrer Auswahl intramuskulär mit in physiologischer Kochsalzlösung gelöstem D-Phe⁶,Gln⁸-GnRH behandelt. Die Injektionen mit Dosen von je 20 µg der genannten Verbindung wurden in 24stündigen Abständen noch zweimal wiederholt. Sowohl in der unbehandelten Kontrollgruppe wie auch in der behandelten Gruppe trat der empfängnisbereite Zustand beim ersten Tier 5 Tage nach der Auswahl der Tiere ein. Beide Bestände wurden in dem gleichen Stall, dem gleichen Luftraum, unter identischen Bedingungen die von der Technologie her zulässigen 26 Tage lang gehalten. Während dieser Zeit gelangten von der unbehandelten Kontrollgruppe 3 Tiere (10%), von der behandelten Gruppe 21 Tiere (70%) erfolgreich in empfängnisbereiten Zustand. Als erfolgreich wurden nur diejenigen Fälle verbucht, bei denen der empfängnisbereite Zustand von normaler Trächtigkeit und Geburt gefolgt war.

In dieser Versuchsreihe erstreckte sich die Zielstellung nicht auf das genaue Einstellen des Ovulationszeitpunktes, weil nicht genügend Zuchteber zur Verfügung standen. Deshalb war die Zielstellung der «erste erfolgreiche empfängnisbereite Zustand» innerhalb von 26 Tagen. Der Anteil von 10% trächtigen Tieren in der Kontrollgruppe entsprach dem Betriebsdurchschnitt. Daher bedeutet der durch die Behandlung eingetretene 60%ige Anstieg einen bedeutenden wirtschaftlichen Nutzen.

Beispiel 15

Behandlung von über längere Zeit unfruchtbaren Chinchillas

20 Chinchillas, die wenigstens seit 2 Jahren unfruchtbar waren, wurden mittels intraperitonealer Injektion drei Tage lang täglich zweimal mit je 10 µg D-Phe⁶,Gln⁸-GnRH behandelt. Am 4. Tag wurden 75 µg des Hormonanalog appliziert. Dann wurden die Tiere der Technologie entsprechend zu den Böcken gelassen. 12 der Chinchillas warfen innerhalb von 4 Monaten.

Parallel zu diesem Versuch wurden 3 besonders wertvolle Chinchillas («Black»-Mutanten), die länger als 2 Jahre unfruchtbar waren, 3 Tage lang täglich zweimal mit je 10 µg D-Phe⁶,Gln⁸-GnRH behandelt. Der Wirkstoff wurde als intraperitoneale Injektion verabreicht. Am 4. Tag wurde das Hormonanalog in einer Dosis von 75 µg appliziert, dann wurden die Tiere wie üblich zu dem Bock gelassen. Innerhalb von 4 Monaten warfen alle drei Tiere.

Mit diesem Verfahren konnten über längere Zeit unfruchtbare, hochwertige Pelztierne erneut in Zucht genommen werden.

Beispiel 16

Beseitigung des saisonbedingten Anöstrus erwachsener Wildkatzen (*Felis silvestris*)

Zwei im Besitz des Tiergartens befindliche weibliche Wildkatzen von durchschnittlich 6 kg Gewicht, deren Zyklus unter natürlichen Bedingungen in die Monate Februar/März fällt, wurden im August mit D-Phe⁶,Gln⁸,desGly¹⁰-GnRH-äthylamid behandelt. Vor der Behandlung wurde zur Inspektion des Zustandes beider Eierstöcke unter Narkose die Bauchhöhle geöffnet. Nachdem die Bauchhöhle wieder zugenäht worden war, wurden die Tiere unter Einhaltung zweitägiger Pausen insgesamt viermal mit dem Wirkstoff behandelt, der, in physiologischer Kochsalzlösung gelöst, intramuskulär appliziert wurde. Zwischen der ersten und der zweiten Injektion wurde eine Pause von zwei Stunden eingehalten; die erste Dosis betrug 100 µg, die zweite 500 µg. Nach 48 Stunden folgte die dritte Dosis (100 µg) und nach zwei weiteren Stunden die vierte (500 µg). Am 0., 2., 4. und 8. Tag wurde die Bauchhöhle unter Narkose geöffnet, die Veränderung des Zustandes der Eierstöcke wurde visuell gewertet. Nach Beendigung der Behandlungen wurden beide Eierstöcke operativ entfernt, fixiert und histologisch ausgewertet.

Am 0. Tag waren im Falle beider Tiere im linken Eierstock 3—4 mutmassliche sekundäre Follikel, ein zurückgebildeter alter Gelbkörper und im rechten Eierstock 5—6 mutmassliche sekundäre Follikel zu sehen. Durch die Behandlung hatten sich nach 4 Tagen alle sekundären Follikel zu Grafschen Follikeln entwickelt, die Ovulation hatte stattgefunden, und an der Stelle der Follikel befanden sich in der Umbildung zum Gelbkörper begriffene Corpora haemorrhagica. Neben letzteren wuchsen in visuell nicht zählbarer Menge sekundäre Follikel, die sich durch die Wirkung der weiteren Behandlungen weiterentwickelten und nach der letzten 500 µg-Dosis mit intrafollikulärer Luteinisierung atretisierten. Die visuellen Befunde wurden durch die histologische Auswertung in vollem Umfang gestützt.

Die durch die beschriebene Behandlung eingetretene Ovulation beweist, dass bei Katzenartigen auch ausserhalb der Saison Befruchtung erreicht werden kann und auch in nicht natürlicher Haltung Nachkommen erzielt werden können.

Beispiel 17

Behandlung eines im saisonbedingten Anöstrus befindlichen Blaufuchsweibchens zwecks Auslösung eines fertilen Östrus

Ein im saisonbedingten Anöstrus befindliches Blaufuchsweibchen wurde im Dezember unter Narkose laparoskopisch untersucht. Es wurde festgestellt, dass beide Eierstöcke inaktiv waren, keine sich entwickelnden Follikel oder Grafsche Follikel enthielten.

Das Tier wurde 10 Tage lang täglich zweimal intramuskulär mit 1—5 µg D-Phe⁶,Gln⁸-GnRH behandelt. Am 10. Tag erfolgte unter Narkose eine erneute laparoskopische Untersuchung. In beiden Eierstöcken befanden sich grosse

Gelbkörper, deren Anzahl — die infolge technischer Unzulänglichkeiten nur geschätzt werden konnte — 10–20 betrug. Gleichzeitig wurde festgestellt, dass der Gebärmutterhals offen war.

Ebenfalls im Dezember wurde ein wegen mangelhafter Verkümmern zum Ausschluss aus der Zucht verurteiltes Weibchen in ähnlicher Weise täglich zweimal mit je 2 µg D-Phe⁶,Gln⁸-GnRH behandelt. Die Wirkung der Behandlung wurde an der Veränderung des Zustandes des Gebärmutterhalses verfolgt. Am 6. Tag nach der ersten Behandlung öffnete sich der Gebärmutterhals. Danach wurde eine Dosis von 50 µg verabreicht. Nach 16 Stunden wurde der Zustand der Eierstöcke durch Spiegelung untersucht; die Ovulation stand unmittelbar bevor. Nun wurde die Bauchhöhle vollständig geöffnet, die Eierstöcke wurden herausoperiert, und aus den insgesamt 11 Graaf'schen Follikeln wurden die Eizellen durch Punktion entfernt. Sechs normale Eizellen wurden gefunden, die von einer normalen Corona radiata bedeckt waren.

Mit diesem Verfahren wurde die Herstellung von zur in vitro Befruchtung geeigneten Eizellen, von Embryos im saisonbedingten Anöstrus, ohne Störung des normalen jährlichen Zyklus, ermöglicht. Das bietet die Möglichkeit zur Herstellung besonderer Hybridnachkommen unter Verwendung weniger wertvoller Rezipiententiere.

Beispiel 18

Stimulierung der Eierstockfunktion infantiler Hauskatzen (*Felis catus domesticus*) mit D-Phe⁶,Gln⁸-GnRH

5 junge Katzen im Alter von 45 Tagen, die ein Gewicht von je etwa 0,3 kg aufwiesen, wurden in Abständen von 2 Tagen insgesamt viermal mit je 100 µg D-Phe⁶,Gln⁸-GnRH behandelt. Der Wirkstoff wurde in physiologischer Kochsalzlösung gelöst und intramuskulär appliziert. Nach Beendigung der Behandlung wurden unter Narkose beide Eierstöcke operativ entfernt und visuell ausgewertet. Anschliessend wurden die Eierstöcke in Formalin fixiert und histologischen Untersuchungen unterzogen. In beiden Eierstöcken waren 5–7 Stück Corpus haemorrhagicum vorhanden. Unter der Rinde wurden von dem hellen, butterfarbenen Eierstock gut abtrennbare, in der Entwicklung befindliche Follikel gefunden, von denen einige die Grösse Graaf'scher Follikel hatten.

Diese Ergebnisse beweisen eindeutig, dass der Eierstock noch infantiler Hauskatzen durch die Wirkung des geschilderten Verfahrens die für das geschlechtsreife Tier charakteristischen histologischen und morphologischen Eigenarten zeigt. Auf diese Weise wird das Tier vor der im herkömmlichen Sinne verstandenen biologischen Geschlechtsreife geeignet, zur Befruchtung in vitro geeignete Eizellen herzustellen.

Beispiel 19

Stimulierung der Eierstockfunktion infantiler Hauskatzen mit D-Phe⁶,Trp⁷,Leu⁸-GnRH

5 junge Katzen im Alter von 45 Tagen, die ein Gewicht von je etwa 0,3 kg aufwiesen, wurden mit D-Phe⁶,Trp⁷,Leu⁸-GnRH behandelt. Vor der Behandlung wurde der linke Eierstock operativ entfernt. Den Tieren wurden in Abständen von 2 Tagen insgesamt dreimal Dosen zu je 100 µg in Form von mit physiologischer Kochsalzlösung bereiteter Lösung intramuskulär verabreicht. Nach dem Abschluss der Behandlung wurde der verbliebene (rechte) Eierstock heraus-

8

operiert, visuell ausgewertet und nach der Fixierung histologischen Untersuchungen unterzogen.

Vor der Behandlung waren die operativ entfernten Eierstöcke völlig homogen und von buttergelber Farbe, sich entwickelnde Follikel konnten in ihnen weder visuell noch durch histologische Untersuchung wahrgenommen werden. Nach der Behandlung wurden in den Eierstöcken 7–8 Stück Corpus haemorrhagicum und viele (nicht zählbare) in der Entwicklung befindliche Follikel gefunden.

Dieses Ergebnis bestätigt die gemäss Beispiel 18 erhaltenen Befunde auch für ein anderes Hormonanalogue in vollem Masse und vermittelt weitere Erfahrungen über die Physiologie des weiteren Zyklus der Eierstöcke.

Beispiel 20

Stimulierung der primordialen Follikel infantiler weiblicher Hauskatzen (*Felis catus domesticus*)

5 junge Katzen im Alter von 45 Tagen, die ein Gewicht von je etwa 0,3 kg aufwiesen, wurden mit D-Phe⁶,Gln⁸-GnRH behandelt. Vor der Behandlung wurde unter Narkose der linke Eierstock operativ entfernt. Dann erhielten die Tiere 3 Tage lang täglich dreimal, in Abständen von 4 Stunden, insgesamt neunmal je 0,1 µg des Wirkstoffes intramuskulär in Form einer mit physiologischer Kochsalzlösung und Propylenglycol bereiteten Suspension. Nach Abschluss der Behandlung wurde der verbliebene Eierstock operativ entfernt, visuell ausgewertet und nach der Fixierung histologischen Untersuchungen unterzogen. Visuell waren beide Eierstöcke homogen und von buttergelber Farbe, der behandelte Eierstock war etwas grösser. In den unbehandelten Eierstöcken konnten nur primordiale Follikel histologisch wahrgenommen werden, während an der Schnittfläche der behandelten Eierstöcke eine nicht zählbare Menge (mehrere hundert) in Entwicklung begriffener, die unterschiedlichen Stadien der Antrumbildung zeigender Follikel registriert wurden.

Mit diesem Verfahren gelang es, mehrere hundert primordiale Follikel des Eierstockes gleichzeitig zu stimulieren.

Beispiel 21

Herstellung von Rindereizellen für die Zwecke der Embryozüchtung in vitro aus einer Organkultur post mortem

Aus Rindern wurden 30–55 Minuten, nachdem sie auf dem Schlachthof betäubt und ausbluten gelassen worden waren, die intakten Eierstöcke entfernt und unter Laboratoriumsbedingungen in ein komplettes Adjuvant gelegt. Zu der Nährflüssigkeit wurde in einer Konzentration von 10⁻⁹ bis 10⁻⁸ g/ml D-Phe⁶,Gln⁸,desGly¹⁰-GnRH-äthylamid gegeben. Die in der Organkultur gehaltenen Eierstockbestände ovulierten innerhalb von 16–43 Stunden. Von den aus den Eierstöcken durch in vitro spontan erfolgte Ovulationen und anschliessende Punktion gewonnenen Eizellen waren 85% zur Fortsetzung der Meiose (der reduktiven Zellteilung) fähig und konnten mit kapazitiertem Rindersperma in vitro erfolgreich befruchtet werden. Die ersten zwei Zellteilungen der in vitro befruchteten Eizellen in der Kultur wurden beobachtet.

Mit diesem Verfahren wurde die Möglichkeit geschaffen, ähnlich wie bei der weltweit verbreiteten Technologie der Insemination bei Rindern, unmittelbar lebende Embryos zu «inseminieren», d.h. zu transplantieren. Auf den Schlachthöfen ist die Möglichkeit zur Herstellung einer den Bedarf weit übersteigenden Menge von Embryos gegeben.

65