Fischer, B., Denker, H. W., und Beier, H. M. (Anatomie und Reproduktionsbiologie, RWTH Aachen, Melatener Straße 211, 5100 Aachen)

Zum Hüllenumbau von präimplantatorischen Kaninchenembryonen in vitro

Der Umbau der extrazellulären Blastozystenhüllen, der physiologischerweise während der Präimplantationsphase in utero erfolgt, wurde an 3 bis 6 Tage alten Kaninchenembryonen untersucht, die 12 bis 48 h in einem Standardsystem (1,5 % BSA) kultiviert wurden. Ergebnisse: 1. Der Zona pellucida(Z)-Abbau ist in vitro massiv gestört. Die Z wird nicht (wie in vivo) oder nur geringfügig abgebaut. 2. Dieser ausbleibende Z-Abbau beeinträchtigt die Blastozystenexpansion. Fehlentwicklungen wie z. B. Trophoblasthernien sind die Folge. 3. Die Bildung der Neozona (NZ) gelingt in vitro nicht. 4. Bei entsprechend alten Embryonalstadien kommt es anstelle des NZ-Aufbaues zu einer z. T. starken Ansammlung eines homogen strukturierten Materials im perivitellinen Raum. 5. Die Ansammlung dieses Materials ist auch bei älteren Embryonen (6. Tag), bei denen bereits in utero eine NZ angelegt wurde, zu beobachten. Offensichtlich unterbleibt eine Fortsetzung der NZ-Strukturierung. Diese Befunde unterstützen unsere These von der essentiellen Bedeutung uteriner Faktoren für die präimplantatorische Normalentwicklung von Kaninchenembryonen. Die Störungen des Zona pellucida-Abbaues und der Neozona-Bildung sind hierfür ein klar erfaßbarer Indikator.

Fischer, B., Denker, H.-W.*, Beier, H. M., Aachen

Zum Hüllenumbau von präimplantatorischen Kaninchenembryonen in vitro*

In der Präimplantationsphase sind an den extrazellulären Hüllen des Kaninchenembryos die in Abb. 1 skizzierten physiologischen Umbauvorgänge zu beobachten[1, 2].

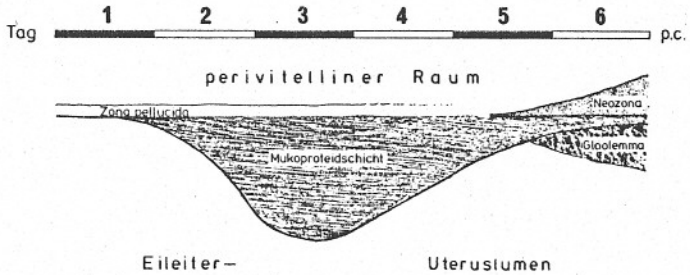

Abb. 1: Der physiologische Hüllenumbau bei Kaninchenembryonen in der Präimplantationsphase

Während der Eileiterpassage kommt es zur Auflagerung der Mukoproteidschicht (M) auf die Zona pellucida (Z). Während der Blastozystenexpansion nimmt die Dicke der Hüllen stetig ab. Um den 4. Tag p. c. beginnt der morphologisch nachweisbare Abbau der Zona pellucida, der ca. 1 Tag später abgeschlossen ist. An der dem Trophoblasten zugewandten Seite der Mukoproteidschicht kommt es ab dem 5. Tag p. c. zum Aufbau der Neozona, an der an das Uteruslumen angrenzenden Seite ab dem 6. Tag p. c. zur Anlage des Glöolemmas.
Ziel der vorliegenden Untersuchung war es festzustellen, ob sich dieser typische Hüllenumbau auch in einem nichtuterinen Milieu vollzieht. Dazu wurden 3, 4, 5 und 6 Tage alte Kaninchenembryonen gewonnen, 12 bis 48 Std. lang in einem Standard in

vitro-System (BSM II-Medium mit 1,5% Rinderserumalbumin, pH 7,4, 280 mosm; 5% CO_2 in Luft) kultiviert und dann lichtmikroskopisch im Semidünnschnitt untersucht. Bei den jüngsten Embryonen, die als späte Morulae oder junge Blastozysten gewonnen wurden und die sich in vitro zu expandierenden Blastozysten Entwikkelten, hält der Hüllenumbau nicht mit der ansonsten zu beobachtenden Weiterentwicklung Schritt: Der Zona pellucida-Abbau bleibt aus (Abb. 2) oder läuft nur unvollständig ab. Die Störung des Zona pellucida-Abbaues resultiert in einer starren Einfassung der Blastozyste durch die Zona (Abb. 2). Dies kann die Behinderung der Blastozystenexpansion bei unphysiologischen Milieubedingungen [3-6] wie z. B. in der In vitro-Kultur und die dadurch bedingten Fehlentwicklungen, z. B. die sich in die Mukoproteidschicht vorwölbenden Trophoblasthernien, erklären.

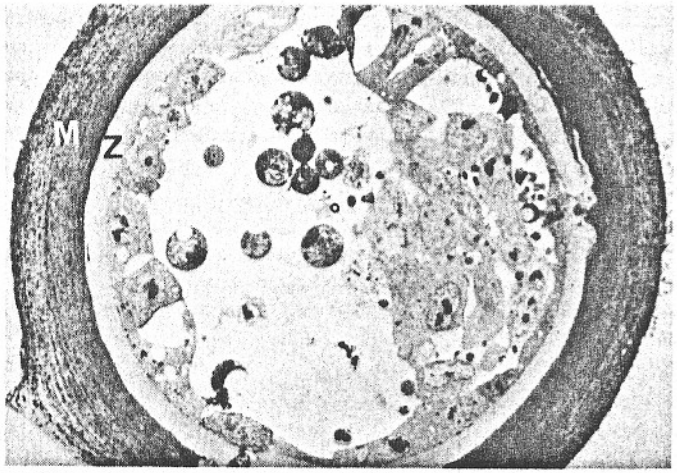

Abb. 2:

Bei den zu Kulturbeginn 4 Tage alten Embryonen bleibt während der bis zu 2-tägigen Kultur die Bildung der Neozona aus. Der perivitelline Raum zwischen Trophoblast und Mukoproteidschicht ist leer, bis auf wiederholt zu beobachtende Zona pellucida-Reststückchen als Überbleibsel des in utero begonnenen aber in vitro nicht vollendeten Zona pellucida-Abbaues. Diese Reststückchen beeinträchtigen die Blastozystenexpansion nicht. Trophoblasthernien oder ähnliche Fehlentwicklungen werden bei kultivierten 4-tägigen Embryonen nur in Ausnahmefällen beobachtet.
Fazit: Der Zona pellucida-Abbau ist in vitro massiv gestört und kann – falls er in utero begonnen wurde – in vitro nicht abgeschlossen werden.
Nur vereinzelt werden erste Lagen einer strukturierten Neozona bei den kultivierten 5 Tage alten Embryonen angetroffen. Vorherrschend ist vielmehr – neben einem lichtmikroskopisch leeren – ein mit einem blaßblauen homogenen Material z. T. prall gefüllter perivitelliner Raum. Das Material gleicht in seiner Anfärbbarkeit der Neozona und tritt nicht bei jüngeren Embryonen auf. Es könnte sich hierbei um Neozonavorstufen handeln.

Bei den 6 Tage alten Embryonen, die bereits zu Kulturbeginn eine Neozona angelegt hatten, finden sich einerseits ähnliche Bilder, nämlich leere oder mit homogenem Material gefüllte perivitelline Räume, andererseits jedoch – im Unterschied zu den 5 Tage alten Embryonen – in nahezu allen Fällen strukturierte Neozonae. Außen auf der Mukoproteidschicht ist das Glöolemma erkennbar.
Aus diesen Beobachtungen folgt, daß der Neozona-Aufbau in vitro nicht gelingt und vermutlich in vitro auch nicht – nach Anfängen in vivo – fortgesetzt wird. Es kommt jedoch zu einer z. T. beachtlichen Ansammlung eines homogenen Materials im perivitellinen Raum, das Neozona-Aufbaumaterial sein könnte, das jedoch in vitro nicht strukturiert wird.
Unsere Befunde unterstreichen die essentielle Bedeutung unteriner Faktoren für die präimplantatorische Normalentwicklung von Kaninchenembryonen. Die gestörte Umwandlung der extrazellulären Embryonalhüllen – die als Beeinträchtigung des Zona pellucida-Abbaues einerseits und der Neozona-Bildung andererseits genau spezifiziert werden kann – stellt ein wertvolles Markersystem zur Kennzeichnung unphysiologischer Milieubedingungen dar und ist damit ein wichtiges Hilfsmittel für die Untersuchung der Bedeutung uteriner Komponenten in der Frühschwangerschaft.

Literatur:

1. *Denker, H.-W. & Gerdes, H.-J., Anat. Embryol. 157,15-34, 1979*
2. *Gerdes, H.-J. & Denker, H.-W., Verh. Anat. Ges. 73, 427-434, 1979*
3. *Beier, H.., in Novel Aspects of Reproductive Physiology, Ed., Spilman, C. H., Wilks, J. W., SP Medical & Scientific Books, New York, London 1978*
4. *Fischer, B., Mootz, U., Barbour, J. C., Jung, E.M.A., Beier, H.M., Anat. Anz. Jena 149, 85-86, 1981*
5. *Fischer, B., Mootz, U., Beier, H.M. 3rd World Congress of Human Reproduction, Berlin 1981, Abstractband S. 229*
6. *Ströbele, R., Fischer, B., Beier, H.M., 3rd World Congress of Human Reproduction, Berlin 1981, Abstractband S. 210*

**gefördert mit Mitteln der DFG, SPP »Biologie u. Klinik d. Reproduktion«*

Abteilung und *Lehrgebiet Anatomie und Reproduktionsbiologie der Medizinischen Fakultät der RWTH Aachen, Melatener Str. 211, 5100 Aachen

Herausgeber: o. Prof. Dr. Dr. h. c. K. Semm, Prof. DDr. h. c. H. Tillmann, Prof. Dr. W. Gehring, Prof. Dr. L. Mettler

Bearbeitung: Wissenschaftlicher Dienst Alete, München

Gesamtherstellung: Druckerei Eimannsberger, 8000 München 2

ISBN: 3-922500-14-5

Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung

Verhandlungsbericht VII. Veterinär-Humanmedizinische Tagung

Gießen, 18.–20. Februar 1982

Im Auftrag der

Deutschen Gesellschaft zum Studium der Fertilität und Sterilität

Österreichischen Gesellschaft zum Studium der Sterilität und Fertilität

Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft Fachgruppe (»Fortpflanzung und ihre Störungen«)

Deutschen Gesellschaft für Züchtungskunde (Sektion »Zuchthygiene«)

Herausgeber: o. Prof. Dr. Dr. h. c. K. Semm, Prof. DDr. h. c. H. Tillmann, Prof. Dr. W. Gehring, Prof. Dr. L. Mettler