Verh. Anat. Ges. 70, S. 839–847 (1976)

Anat.Anz.Suppl. 140

H.-W. Denker, Aachen:

Aus der Abteilung Anatomie der Medizinischen Fakultät der RWTH Aachen
(Vorstand: Prof. Dr. med. W. Kühnel)

Wechselbeziehungen zwischen Blastozyste und Endometrium bei der Implantation: Beeinflussung der endometrialen Aminosäure-Arylamidase-Aktivität durch die Blastozyste

Mit 5 Abbildungen und 1 Tabelle im Text

Summary

The activity of a leucine-β-naphthylamide splitting arylamidase, an aminopeptidase-type enzyme previously also referred to as leucine aminopeptidase, considerably increases in rabbit endometrium during preimplantation under the influence of maternal progesterone. Applying a histochemical section freeze-substitution technique, the enzyme is localized sharply in apical parts of uterine epithelial cells, in their apical protrusions and in granular secretion material likely derived from the latter. Studies of longitudinal sections of blastocyst-containing uteri give evidence for local influence of the blastocyst on arylamidase activity of the surrounding endometrium: Whereas, until 8 days post coitum (d p.c.), only little changes are observed in interblastocyst endometrial segments (as well as in pseudopregnant uteri), the activity declines remarkably at the blastocyst site uterine epithelium which, in its mesometrial part, looses the intense reaction of the apical cytoplasm. This is shown already in the $6^2/_3$ d p.c. stage, i. e. as soon as the blastocyst is trapped at the future implantation site, and when the extracellular coverings are still surrounding the blastocyst. Agarose beads of blastocyst size do not induce any comparable change in endometrial arylamidase activity. Arylamidase depletion in the blastocyst site uterine epithelium is thought to result from enhanced discharge of enzyme into uterine secretion, locally induced by chemical stimuli from the blastocyst. The possible (hormonal?) nature of these stimuli is discussed.

Während Einflüsse des mütterlichen physiologischen Milieus auf die Entwicklung der Säugetierblastozyste während der Präimplantations- und Implantationsphase gut untersucht und gesichert sind (zur Übersicht vergleiche Adams 1965, 1969; Beier 1974; Chang 1967; Hafez 1971), gibt es nur wenige Daten, die Wirkungen der Blastozyste auf die Biochemie der umgebenden mütterlichen Gewebe belegen (Lutwak-Mann, Boursnell and Bennett 1960; Hafez and White 1967; Beier 1971; Daniel 1972; Moulton 1974).
Beim Kaninchen steigt im Uterusepithel die Aktivität eines Enzyms vom Aminopeptidasetyp steil an zum Zeitpunkt, zu dem die Keime in den Uterus übertreten (3 Tage post coitum, d p.c.) (Denker 1969, 1971). Dies geschieht unabhängig von der Anwesenheit der Keime, vielmehr auch im Uterus pseudogravider Weibchen,

und zwar in Abhängigkeit vom mütterlichen Progesteronspiegel (KÜHNEL, BEIER und PETRY 1971; BEIER, KÜHNEL und PETRY 1972; DENKER und VAN HOORN 1974; VAN HOORN in Vorbereitung). Das Enzym gehört zur Gruppe der Aminopeptidasen und wurde zunächst als Leucinaminopeptidase aufgefaßt, zeigt aber biochemisch Verschiedenheiten von gereinigter Leucinaminopeptidase und ist entsprechend dem bevorzugt umgesetzten Substrattyp (Aminosäure-Naphthylamide und Aminosäure-p-Nitroanilide) als Aminosäure-Arylamidase zu bezeichnen (PATTERSON, HSIAO und KEPPEL 1963; BERGMEYER 1970; DENKER und STANGL 1974). Es geht in beträchtlicher Konzentration in das Uterussekret über (VAN HOORN, in Vorbereitung) und dürfte als eines der Peptidbindungen-spaltenden Enzyme, die im Zusammenhang mit dem Implantationsvorgang eine Rolle spielen, einzustufen sein.

In vorausgegangenen Untersuchungen, die sich auf den Implantationsort konzentrierten, war ab 7 d p.c. ein Abfall der Aktivität dieses Enzyms im Endometrium festgestellt worden (DENKER 1969, 1971). Dieser Abfall wurde jetzt genauer studiert, und in diesem Zusammenhang wurden enzymtopochemisch die Endometriumspartien, die den Blastozysten anliegen, mit den weiter entfernten Schleimhautpartien verglichen.

Material und Methoden

Verwendet wurden Mischlingskaninchen aus der Zucht der Arbeitsgruppe Gottschewski am Max-Planck-Institut für Immunbiologie, Freiburg/Br. Für die Untersuchung der normalen Gravidität wurden 20 geschlechtsreife Weibchen, 8–17 Monate alt und 3,0 bis 4,2 kg schwer, mit je 2 fertilen Böcken belegt.

Für Versuche mit Blastozysten-Atrappen wurden 2 weitere Weibchen, 14 Monate alt und 3,6 bzw. 4,3 kg schwer, mit je 2 vasektomierten Böcken belegt, um Pseudogravidität auszulösen. 6 Tage post coitum (d p.c.) wurden sie unter Thiogenal®-Narkose (ZIMMERMANN 1964) laparotomiert. Durch einen kleinen Schnitt in der dünnen antimesometralen Uteruswand wurden am tubalen Ende 2–4 Kugeln von 4,5 mm Durchmesser inseriert. Diese Kugeln waren zuvor unter Einhaltung steriler Kautelen aus 1,5 % Agaroselösung in 0,9 % NaCl in einer Form gegossen worden. Die Wunde in der Uteruswand wurde durch eine Catgut-Naht verschlossen.

Zum angegebenen Zeitpunkt post coitum wurden die Tiere durch Genickschlag und Carotidenschnitt getötet, die Uteri wurden schnell entnommen und mit flüssigem Stickstoff nativ eingefroren. Histochemische Arylamidasetests wurden an 14 μm-dicken Kryostat-Längsschnitten durchgeführt, und zwar sowohl (1) an nativ montierten Schnitten entsprechend der von NACHLAS et al. (s. PEARSE 1972) angegebenen Methode (Diazoniumsalz: Fast Blue B · $ZnCl_2$, Serva Nr. 21 270) als auch (2) nach Schnitt-Gefriersubstitution und Fettextraktion entsprechend dem Angaben von GLENNER (1962) (Diazoniumsalz: Fast Garnet GBC · $ZnCl_2$, Serva Nr. 21 290). Als Substrate kamen sowohl L-Leucin-β-Naphthylamid (Serva Nr. 27 730) als L-Leucin-4-Methoxy-β-Naphthylamid (Serva Nr. 27 727) zur Anwendung; nach Schnitt-Gefriersubstitution (Methode 2) ist die Lokalisation weitaus am besten und auch mit Leucin-β-Naphthylamid so scharf, daß auf das Methoxy-Substrat verzichtet werden kann (DENKER und STANGL 1974). Einschluß bei Methode (1) in $CuSO_4$-haltiger Glycerin-Gelatine, bei Methode (2) in Highman's Variante des Aphthyschen Gummi-Arabicum (s. LILLIE 1965, S. 101).

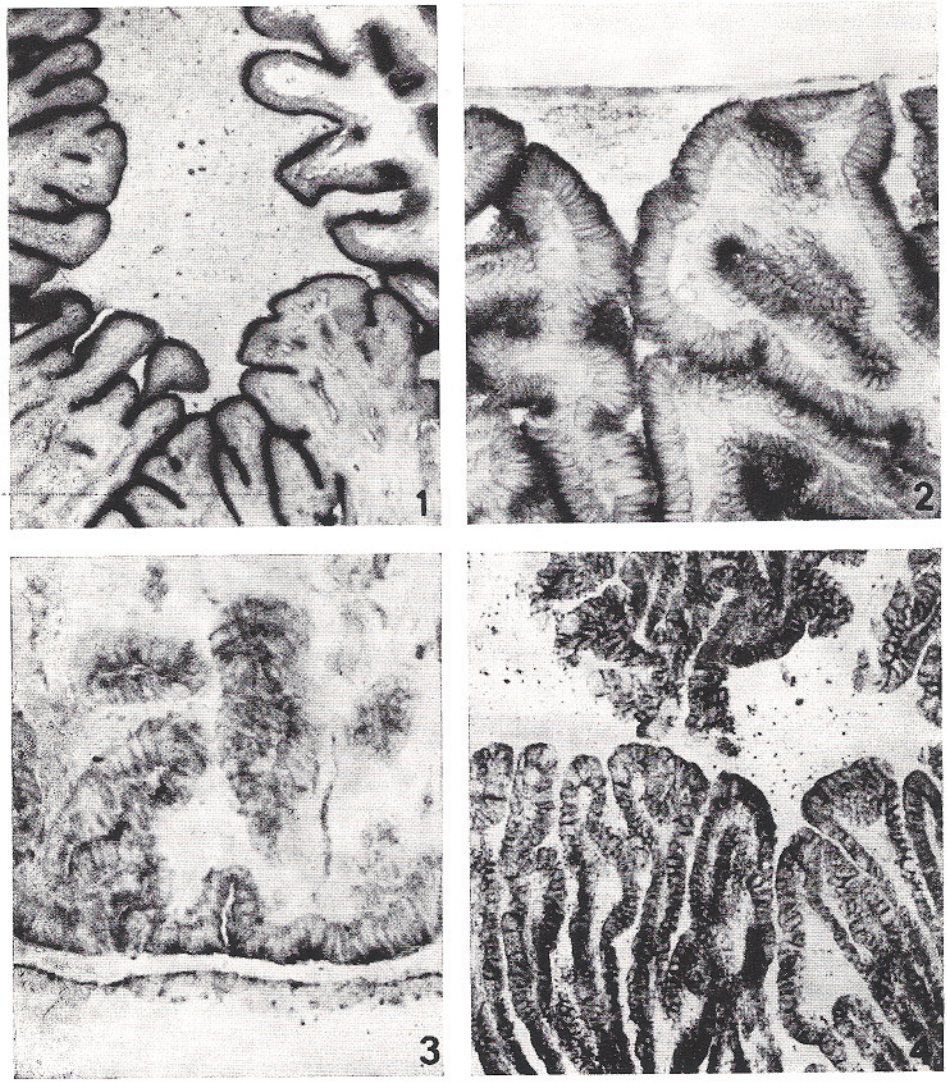

Abb. 1–4. Schnitt-Gefriersubstitution, Arylamidase-Nachweis nach Methode (2).

Abb. 1. Endometrium 5 d p.c. 90×. Stark positive Reaktion der apikalen Partien der Uterusepithelzellen. Das Uteruslumen ist mit Arylamidase-positivem Sekret erfüllt.

Abb. 2. Endometrium und Blastozyste (oben) 6 d p.c. 220×. Reaktionsprodukt findet sich im apikalen Zytoplasma der Uterusepithelzellen und in den Granula des Sekretes, ferner im Trophoblasten. Die Blastozystenhöhle (oben) erscheint leer.

Abb. 3. Mesometrales Endometrium und Keimscheibe einer Blastozyste (unten), 7 d p.c. 140×. Die Blastozystenhüllen sind noch nicht aufgelöst und als weißes Band zwischen Keimscheibe und Uterusepithel zu erkennen. Kaum noch eine Arylamidase-Aktivität nachweisbar.

Abb. 4. Endometrium, Blastozysten-fern, 8 d p.c. 140×. Mäßig starke Aktivität im Uterusepithel, das jedoch die starke apikale Reaktion verloren hat. Im Uterussekret noch positiv reagierende Granula erkennbar.

Ergebnisse

Beide Methoden, (1) und (2), erbrachten hinsichtlich des Vergleichs von Blastozysten-fernen und Blastozysten-nahen Endometriumsabschnitten grundsätzlich ähnliche Ergebnisse; bei der Angabe von cytologischen Details beziehen wir uns aber auf die an gefriersubstituierten Schnitten (2) erhobenen Befunde, da in diesem Fall die Lokalisation weitaus am schärfsten war.

Zum Zeitpunkt des Maximums der Enzymaktivität, das sich 5–6 d p.c. findet (Denker 1969, 1971; Beier, Petry und Kühnel 1970), reagieren sehr stark und fast ausschließlich die apikalen Partien der *Uterusepithelzellen* (Abb. 1, 2) einschließlich ihrer Protrusionen, die sich ins Uteruslumen vorwölben. Die Gefrier-

Tabelle 1. Arylamidaseaktivität des Endometriums beim Kaninchen; histochemischer Nachweis. Vergleich keimnaher und keimferner Abschnitte in verschiedenen Stadien der Trächtigkeit

I Stadium	II Tier Nr.	III Zahl der Corpora lutea	IV Zahl der Keime	V Zahl der untersuchten Uterusstücke	VI Arylamidaseaktivität im Endometrium	
					a keimnah gleich keimfern (Zahl der Uterusstücke)	b keimnah vermindert (Zahl der Unterusstücke)
5	H 1	8	*	3	3	
5	H 2	11	*	2	2	
6	H 3	7	7	3	3	
6	H 4	9	8	6	5	1[1])
6	H 5	12	12	3	3	
$6^2/_3$	H 6	13	13	1		1
$6^2/_3$	H 7	8	8	3		3[2])
7	H 8			7		7
7	H 9	7	7	1		1
7	H 10	11	11	2		2
7	H 11	9	9	9	9	
7	H 12	11	11	9		9
$7^1/_3$	H 13	10	9	6		6
$7^1/_3$	H 14	11	11	2		2
8	H 15	(14)	14	1		1
8	H 16	11	6	1		1
8	H 17	11	10	1		1
8	H 18	6	3	1		1
8	H 19	9	9	1		1
8	H 20	8	8	1		1

* Zählung nicht möglich

[1]) unsicher

[2]) ein Objekt unsicher

substitutionstechnik ermöglicht eine Erhaltung des Uterussekretes (während dieses bei Nativschnitten vom flüssigen Inkubationsmedium ausgewaschen wird und durch Verschmierung über die umgebenden Gewebspartien wahrscheinlich zu der bei diesen Schnitten unbefriedigenden Schärfe der Lokalisation beiträgt). Das Sekret enthält, dichtgepackt, Granula verschiedener Größe, die stark positiv reagieren; Erweiterungen des Uteruslumens, auch in der Umgebung von Blastozysten, erscheinen erfüllt von diesem Arylamidase-positiven Sekret. Die Aktivität des Uterusepithels ist über die ganze Länge des Uterus gleich stark, d. h. es zeigen sich keine Unterschiede zwischen den den Blastozysten anliegenden Partien des Endometriums und den Blastozysten-fernen Abschnitten (Tabelle 1).
Zum Zeitpunkt $6^2/_3$ d p.c. treten jedoch solche Unterschiede auf (Tabelle 1). In der Umgebung der Blastozysten verlieren die Uterusepithelzellen im mesometralen Endometrium ihre starke Aktivität des apikalen Cytoplasmas, und nur eine geringe Reaktion der Zellperipherie (auch lateral und basal) verbleibt, so daß die Zellen „entleert" erscheinen (Abb. 3). In weiterer Entfernung von den Blastozysten, sowohl in Richtung der Längsachse des Uterus als auch in der Tiefe von Schleimhautbuchten in der Nähe der Blastozyste, ist die starke apikale Reaktion erhalten, zusätzlich wird hier aber nun auch eine mäßige Reaktion der basalen Zellabschnitte deutlich.

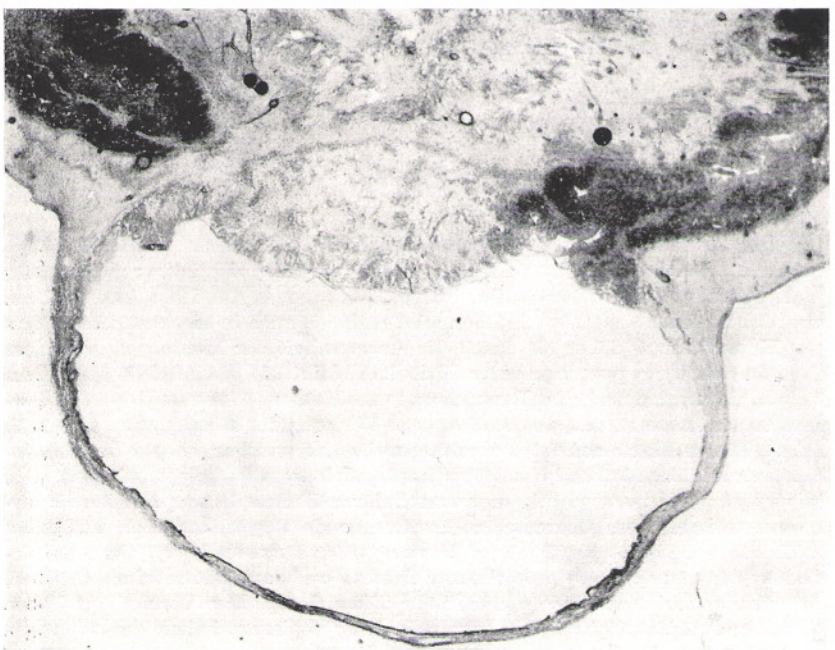

Abb. 5. Übersichtsuafnahme, Längsschnitt durch Uterus und Blastozyste 8 d p.c. 7,5×. Die mesometrale Seite liegt im Bild oben. Nativschnitt, Arylamidasenachweis nach Methode (1). Die Arylamidaseaktivität der Blastozysten-fernen Endometriumspartien (links oben und rechts oben) bricht beim Übergang in die Schleimhaut der (von der großen Blastozyste aufgeblähten) Implantationskammer jäh ab.

In den Stadien 7 und 8 d p.c. breitet sich der beschriebene Verlust der starken Aktivität des Uterusepithels von den den Blastozysten unmittelbar anliegenden Schleimhautpartien in weiter entfernte Abschnitte aus. Jetzt ist der Unterschied auch auf Übersichtsaufnahmen nicht zu übersehen (Abb. 5).
Das antimesometrale Endometrium am Implantationsort (zukünftiger Obplacentarbereich) verhält sich anders als das mesometrale Endometrium (Placentarfelder) insofern, als hier das apikale Maximum der Aktivität erhalten bleibt und nur insgesamt die Aktivität vermindert ist, während mesometral die apikale Reaktion verlorengeht. Die zwischen den Blastozysten gelegenen Partien des Endometriums zeigen 8 d p.c. noch deutliche, nur mäßig verminderte Aktivität, doch schwindet bis zu diesem Zeitpunkt auch hier die apikale Betonung der Reaktion mehr und mehr (Abb. 4).
Die Reaktion des *Uterussekretes* geht nach $6^2/_3$ d p.c. überall stark zurück. In der *Blastozystenhöhle* läßt sich histochemisch in keinem Stadium nennenswerte Arylamidase-Aktivität nachweisen. Die *Bastozystenhüllen* zeigen keine oder nur geringfügige Färbung, während der *Trophoblast* deutlich positiv reagiert.
Ein Tier des 7-d-p.c.-Stadiums (H 11) zeigte ein abweichendes Verhalten: In der Umgebung aller seiner 9 Blastozysten war keine Abschwächung der Arylamidase-Aktivität des Endometriums zu erkennen (Tabelle 1), obwohl die Blastozysten von normaler Größe und auch im übrigen morphologisch unauffällig waren.
In der Umgebung von Blastozysten-Atrappen, d. h. in den Uterus übertragenen Agarose-Kugeln von Blastozystendurchmesser, zeigte sich 7 und 8 d p.c. in keinem Fall ein vergleichbarer Abfall der Arylamidase-Aktivität des Endometriums.

Diskussion

Beim Kaninchen gibt es keine festgelegten Implantationsorte im Uterus, vielmehr hängt die Lokalisation der Blastozysten von ihrer Zahl ab, und sie verteilen sich immer gleichmäßig über die Länge des Uterus (Böving 1954). Der lokale Abfall der Arylamidase-Aktivität am Implantationsort, der in dieser Arbeit beschrieben wird und sich auch in biochemischen Tests zeigen läßt (van Hoorn), muß daher als durch die Anwesenheit der Blastozyste ausgelöst aufgefaßt werden. In den Uteri pseudogravider Weibchen bleibt die biochemisch gemessene Aktivität bis 8 d p.c. unvermindert hoch (Denker und van Hoorn 1974; van Hoorn in Vorbereitung). Es ist bemerkenswert, daß die beschriebene Wirkung der Blastozysten sehr früh eintritt ($6^2/_3$ d p.c.). Dieses Phänomen ist demnach bereits nachweisbar, sobald der Blastozysten-Verteilungsvorgang beendet und damit der Implantationsort festgelegt ist; zu diesem Zeitpunkt ist die Blastozyste noch von ihren extrazellulären Hüllen (Zona pellucida, Mucoproteidschicht, evtl. weitere, vom Uterussekret herstammende Lagen) umgeben und kann noch aus dem Uterus ausgespült werden (vgl. Böving 1954; Denker 1970). Da Agarosekugeln von Blastozystengröße keine vergleichbaren Effekte auf das Endometrium ausüben, handelt es sich offenbar nicht um eine mechanische Einwirkung. Der Verlust der hohen Aktivität der apikalen Cytoplasmapartien und der apikalen cytoplasmatischen Vorwölbungen der Uterusepithelzellen legt die Vermutung nahe, daß die Blastozyste lokal eine *verstärkte Sekretausschleusung* aus dem Uterusepithel stimuliert, was zur Entleerung der Zellen führt. Es wäre gut denkbar, daß die in dieser Arbeit erstmals beschriebenen Arylamidase-positiven Granula im Uterussekret abgeschnürte apikale Protrusionen (Beier, Kühnel und Petry 1972) repräsentieren. Interessant erscheint, daß elektronenmikroskopische Untersuchungen am Frettchen einen Verlust der Sekretgranula aus den die Blastozyste umgebenden Uterus-

epithelzellen zeigten (ENDERS und SCHLAFKE, 1972). – Als weitere Möglichkeit ist eine lokale *Blockade der Nachlieferung (Neusynthese)* der Arylamidase zu diskutieren.

Bemerkenswert ist, daß bei einem Tier 7 d p.c. keine Änderung der Arylamidase-Aktivität in der Umgebung der Blastozysten zu verzeichnen war. Es kann nicht gesagt werden, ob sich diese Blastozysten normal implantiert hätten. Ob die antimesometrale Implantation regelrecht erfolgt ist, läßt sich 8 d p.c. beurteilen. Alle untersuchten 8-d-Keime waren normal implantiert, und hier war stets die lokale Verminderung der endometrialen Arylamidase-Aktivität deutlich.

Die chemische Natur des möglicherweise von der Blastozyste ausgehenden Signals ist bislang unbekannt. Es liegt nahe, an von ihr produzierte *Hormone* zu denken, wie sie in neueren Arbeiten postuliert (BEIER 1968) und zum Teil demonstriert werden (SEAMARK and LUTWAK-MANN 1972; PERRY, HEAP and AMOROSO 1973; DICKMANN and DEY 1974; DICKMANN, DEY and GUPTA 1975; DICKMANN und GUPTA 1974; SAXENA, HASAN, HAOUR and SCHMIDT-GOLLWITZER 1974; HAOUR and SAXENA 1974). Der beschriebene Abfall der Arylamidase-Aktivität im Endometrium wäre dann der erste Nachweis eines lokalen Effekts dieser Hormone der Blastozyste auf das umgebende Uterusgewebe.

Literatur

ADAMS, C. E.: Influence of maternal environment on preimplantation stages of pregnancy in the rabbit. In: WOLSTENHOLME, G. E. W., and O'CONNOR, M. (Eds.): Preimplantation stages of pregnancy. Churchill, London, p. 345–377 (1965).

– Egg-uterus interrelationships. In: RASPÉ, G. (Ed.): Advances in the Biosciences, Vol. 4. Pergamon Press, Oxford; Vieweg, Braunschweig, p. 149–163 (1969).

BEIER, H. M.: Biochemisch-entwicklungsphysiologische Untersuchungen am Proteinmilieu für die Blastozystenentwicklung des Kaninchens (Oryctolagus cuniculus). Zool. Jahrb. Abt. Anat. Ontog. Tiere **85**, 72–190 (1968).

– Die Pseudogravidität des Kaninchens nach Stimulierung mit Choriongonadotropin. Dissertation, Med. Fak. Marburg 1971.

– Oviducal and uterine fluids. J. Reprod. Fert. **37**, 221–237 (1974).

– W. KÜHNEL und G. PETRY: Morphologische und biochemische Befunde am pseudograviden Kaninchenendometrium nach gonadotroper Stimulierung. Verh. Anat. Ges., Zagreb 1971. Anat. Anz. Suppl. **130**, 445–457 (1972).

– G. PETRY and W. KÜHNEL: Endometrial secretion and early mammalian development. 21. Coll. Ges. Biol. Chem., Mosbach 1970. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, p. 264–285 (1970).

BERGMEYER, H.-U.: Methoden der enzymatischen Analyse. Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr., 1970.

BÖVING, B. G.: Blastocyst-uterine relationships. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **19**, 9–28 (1954).

CHANG, M. C.: The reaction of uterine endometrium on spermatozoa and eggs. In: LAMMING, G. E., and E. C. AMOROSO (Eds.): Reproduction in the female mammal. Butterworths, London, p. 459–477 (1967).

DANIEL, J. C. jr.: Local production of protein during implantation in the rabbit. J. Reprod. Fert. **31**, 303–306 (1972).

DENKER, H.-W.: Zur Enzym-Topochemie von Frühentwicklung und Implantation des Kaninchens. Dissertation, Med. Fak. Marburg, 1969.

– Topochemie hochmolekularer Kohlenhydratsubstanzen in Frühentwicklung und Implantation des Kaninchens. I. Allgemeine Lokalisierung und Charakterisierung hochmolekularer Kohlenhydratsubstanzen in frühen Embryonalstadien. Zool. Jahrb. Abt. Allgem. Zool. u. Physiol. **75**, 141–245 (1970).

Diese Untersuchungen wurden durch Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt (De 181/3).

DENKER, H.-W.: Enzym-Topochemie von Frühentwicklung und Implantation des Kaninchens. III. Proteasen. Histochemie **25**, 344–360 (1971).
– and G. VAN HOORN: Peptidases related to implantation in the rabbit: local stimulation of endometrial arylamidase secretion by the blastocyst immediately preceding implantation. Abstract, Seventh Ann. Meet. Soc. for the Study of Reproduction, Ottawa, Canada 1974.
– und R. STANGL: Versuche zur Lokalisierung und Abgrenzung verschiedener Aminosäure-Arylamidasen in Uterus und Blastozyste des Kaninchens. 17. Sympos. Ges. f. Histochemie, Bozen 1974. Acta histochem. Suppl. **XVI** (im Druck).
DICKMANN, Z., and S. K. DEY: Steroidogenesis in the preimplantation rat embryo and its possible influence on morula-blastocyst transformation and implantation. J. Reprod. Fert. **37**, 91–93 (1974).
– S. K. DEY and J. S. GUPTA: Steroidogenesis in rabbit preimplantation embryos. Proc. Nat. Acad. Sci. USA **72**, 298–300 (1975).
– and J. S. GUPTA: Δ^5-3β-Hydroxysteroid dehydrogenase and estradiol-17β-hydroxysteroid dehydrogenase activity in preimplantation hamster embryos. Develop. Biol. **40**, 196–198 (1974).
GLENNER, G. G.: The preservation of peptidase activity localization using β-naphthylamide substrates. J. Histochem. Cytochem. **10**, 257–258 (1962).
HAFEZ, E. S. E.: Some maternal factors affecting physiochemical properties of blastocysts. In: BLANDAU, R. J. (Ed.): Biology of the Blastocyst. University of Chicago Press, Chicago and London, p. 139–191 (1971).
– and I. G. WHITE: Endometrial and embryonic enzymes in relation to implantation of the rabbit blastocyst. Anat. Rec. **159**, 273–280 (1967).
HAOUR, F., and B. B. SAXENA: Detection of a gonadotropin in rabbit blastocyst before implantation. Science **185**, 444–445 (1974).
VAN HOORN, G.: Dissertation (in Vorbereitung).
KÜHNEL, W., H. M. BEIER und G. PETRY: Untersuchungen zur hormonellen Regulation der Präimplantationsphase der Gravidität. II. Histologische, topochemische und biochemische Analysen am hormonbehandelten, pseudograviden Kaninchenuterus. Cytobiologie **4**, 9–40 (1971).
LILLIE, R. D.: Histopathologic Technic and Practical Histochemistry. 3rd ed. McGraw-Hill (Blakiston Div.), New York etc., 1965.
LUTWAK-MANN, C., J. C. BOURSNELL and J. P. BENNETT: Blastocyst-uterine relationships: uptake of radioactive ions by the early rabbit embryo and its environment. J. Reprod. Fert. **1**, 169–185 (1960).
MOULTON, B. C.: Ovum implantation and uterine lysosomal activity. Biol. Reprod. **10**, 543–548 (1974).
PATTERSON, E. K., S. HSIAO and A. KEPPEL: Studies on dipeptidases and aminopeptidases. I. Distinction between leucine aminopeptidase and enzymes that hydrolyze L-leucyl-naphthylamide. J. Biol. Chem. **238**, 3611–3620 (1963).
PEARSE, A. G. E.: Histochemistry. Theoretical and Applied. 3rd ed., Vol. 2. Churchill, London, 1972.
PERRY, J. S., R. B. HEAP and E. C. AMOROSO: Steroid hormone production by pig blastocysts. Nature **245**, 45–47 (1973).
SAXENA, B. B., S. H. HASAN, F. HAOUR and M. SCHMIDT-GOLLWITZER: Radioceptor assay of human chorionic gonadotropin: detection of early pregnancy. Science **184**, 793–795 (1974).
SEAMARK, R. F., and C. LUTWAK-MANN: Progestins in rabbit blastocysts. J. Reprod. Fert. **29**, 147–148 (1972).
ZIMMERMANN, W.: Methoden für experimentelle Untersuchungen am Kaninchen während der frühen Embryonalentwicklung. Zbl. Bakteriol., Parasitenkunde, Infektionskrankh. Hyg., I. Abt., Orig. **194**, 255–266 (1964).

Anschrift des Verfassers: Dr. med. Dr. rer. nat. H.-W. DENKER, Abteilung Anatomie der RWTH, 5100 Aachen (BRD), Melatener Straße 211.

Aussprache

KAUFMANN: In der Literatur wurde in den vergangenen Jahren mehrfach das in den weiblichen Geschlechtsorganen existierende, als Leucinaminopeptidase bezeichnete, Leucinnaphthylamide spaltende Enzym als Oxytocinase eingeordnet. Kann man diese Angabe nach Ihren Untersuchungen als widerlegt betrachten?

GOSSRAU: Warum setzen Sie ihrem Ansatz zur Naphthylamidasen-Darstellung CN^- zu? Wir haben seine Wirkung auf diese Enzymgruppe mit L-Leucin-2-naphthylamid als Substrat gemessen und keinerlei Effekt festgestellt. Die Anwesenheit von Naphthylamidasen im Uteruslumen bzw. -sekret ist sicherlich nicht anzuzweifeln. Offen bleibt aber wohl, woher das Enzym letztlich stammt. Haben Sie z. B. irgendwelche morphologischen Hinweise für eine Sekretion dieser Peptidasen aus dem Uterusepithel? Ihren Verzicht auf das substituierte 2-Naphthylamid in Verbindung mit Fast Garnet GBC halte ich nicht ganz für gerechtfertigt; denn Echtgranatsalz kuppelt auch mit unsubstituiertem 2-Naphthylamin langsamer und inhibiert in der Regel stärker als Fast Blue B. Außerdem hat Fast Garnet GBC gegenüber den Echtblausalzen weitere Nachteile, wie die Auskristallisation seines Azofarbstoffes und dessen Unfähigkeit, durch Chelation stabile Reaktionsprodukte zu bilden.

DENKER (Schlußwort): zu KAUFMANN: Wir haben Versuche mit L-Cystin-di-β-naphthylamid durchgeführt, dem Substrat, das ja von einer Reihe der von Ihnen angesprochenen Autoren als Oxytocinase-spezifisch (wenn auch vielleicht weniger rapide umsetzbar als Leucin-β-naphthylamid) angesehen wird. Dabei haben wir in unserem Material keine nennenswerte Aktivität gefunden.

Zu GOSSRAU: Zunächst kann ich auf Grund von eigenen Kontrollversuchen Ihre Beobachtung bestätigen, daß Cyanidionen in der verwendeten Konzentration keinen Effekt (weder Aktivierung noch Hemmung) auf dieses Enzym zeigen. Wir haben dennoch bewußt CN^- im Inkubationsmedium belassen und auch im übrigen an der Originalvorschrift von NACHLAS et al. festgehalten, da es uns darum ging, direkt mit unseren früheren Serien (DENKER 1969, 1971) vergleichen zu können. Außerhalb der hier besprochenen Versuchsserie haben wir die Effekte der Variation einer ganzen Reihe von verschiedenen Komponenten und Parameter untersucht (mitgeteilt z. T. in: DENKER und STANGL 1974). Die An- oder Abwesenheit von Cyanidionen ist ohne Belang für den unterschiedlichen Reaktionsausfall in blastozystenfernen und blastozystennahen Endometriumsabschnitten.
Fast Garnet GBC würde ich nicht so generell ablehnen, wie Sie es tun. In unseren erwähnten Untersuchungen (DENKER und STANGL 1974) fanden wir, daß bestimmte Arylamidasen m unserem Material offenbar durch Fast Blue B stärker gehemmt werden als durch Fast Garnet GBC. Ich halte es daher für sehr sinnvoll, mindestens diese beiden Kopplungssalze vergleichsweise heranzuziehen. Eine Instabilität des mit Fast Garnet gebildeten Farbstoffes zeigt sich besonders bei nativen, nicht entfetteten Schnitten; nach der hier verwendeten Gefriersubstitution in Aceton und Nachbehandlung mit Chloroform ist die Situation unvergleichlich besser, vor allem wenn man dann noch in Apathy's Medium einschließt. Die Gefriersubstitution eröffnet damit die *Möglichkeit,* auch Fast Garnet zu testen, aber selbstverständlich kann man auch in diesem Fall Fast Blue B verwenden und sich dessen Vorteil der größeren Stabilität zunutze machen, sofern es nicht stärker hemmt.
Eine Sekretion der Arylamidase ins Uteruslumen ist bislang nicht eindeutig bewiesen, erscheint uns aber nach unseren Befunden wahrscheinlich. Das morphologische Bild paßt gut zur Annahme einer Sekretion: hohe Arylamidase-Aktivität der apikalen zystoplasmatischen Protrusionen der Uterusepithelzellen, und ebenso im Sekret positiv reagierende Granula, die wohl abgeschnürte derartige Granula darstellen könnten. Im biochemischen Test (VAN HOORN) zeigt sich, daß die spezifische Aktivität (mg/mU Protein) im Uterussekret unvergleichlich höher ist als im Serum, auch scheint es zwischen Uterus- und Serum-Arylamidasen Unterschiede in einigen biochemischen Eigenschaften zu geben.