Verh. Anat. Ges. 71, S. 531–535 (1977)

H. W. Denker und W. Kühnel, Aachen:

Aus der Abteilung Anatomie der Medizinischen Fakultät an der Rhein.-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
(Vorstände: Prof. Dr. med. W. Kühnel und Prof. Dr. med. W. Lange)

Experimente zum Wirkungsmechanismus von Kupfer-IUDs beim Kaninchen: Lokale Beeinflussung der endometrialen Aminosäure-Arylamidase-Aktivität durch Kupfer-IUDs

Summary

Blastocyst-shaped copper IUDs (CuIUDs) are shown to cause, in the surrounding uterine epithelium and secretion of pregnant rabbits, a dramatic decrease of amino acid arylamidase activity, the effect becoming demonstrable histochemically already within 24 hours after insertion of the CuIUDs. This phenomenon hat not been seen in experiments with copper-free IUDs and hormone-containing IUDs. In regular pregnancy, a local decline in endometrial arylamidase activity is induced by the attaching blastocyst which stimulates discharge of the enzyme from the uterine epithelium into the uterine secretion. Biochemical tests reveal a strong inhibition of endometrial arylamidase by Cu^{++} ions. It is assumed that CuIUDs exert their effect by direct enzyme inhibition rather than by other mechanisms which are briefly discussed.

Einleitung

In tierexperimentellen Untersuchungen ist klar gezeigt worden, daß IUDs, und insbesondere Kupfer-IUDs (CuIUDs), mit der Entwicklung und Implantation der Blastozysten interferieren. Der Wirkungsmechanismus ist jedoch immer noch weitgehend ungeklärt. Besondere Beachtung gefunden hat die Tatsache, daß CuIUDs zu einer oft erheblichen Ansammlung von Leukozyten im Uteruslumen führen; daneben können IUDs eine Deziduareaktion auslösen oder die Aktivität verschiedener uteriner Enzyme (z. B. fibrinolytische Aktivität im Uterussekret) beeinflussen, und zwar in einer Weise, die je nach chemischer Zusammensetzung der IUDs und nach Tierart stark wechselt. Diese Beobachtungen ermöglichen es jedoch bislang nicht, sich ein klares Bild davon zu machen, welche physiologischen Prozesse im Keim oder in dem komplexen System von Wechselbeziehungen zwischen Keim und Mutter es sein mögen, an denen die IUDs ihren Angriffspunkt nehmen (vgl. Chang und Tatum, 1975; Duncan und Wheeler, 1975; Grundsell, 1975; Larsson et al., 1975; Makino et al., 1972; Nutting und Müller 1975; Nutting et al., 1975; Shaw et al., 1970; Tobert, 1975).
Im Zuge unserer Untersuchungen über die Rolle von Peptidasen in der Präimplantationsphase und bei der Implantation hatten wir gefunden, daß die Blastozyste beim Kaninchen die Aktivität einer Aminosäure-Arylamidase (zunächst als Leuzinaminopeptidase eingestuft, s. Denker, 1969; Petry et al., 1970) im sie unmittel-

bar umgebenden Endometrium lokal beeinflußt, und zwar stimuliert sie kurz vor Beginn der Implantation offenbar die Ausschleusung des Enzyms aus den Uterusepithelzellen in das Uterussekret hinein (DENKER, 1976; VAN HOORN und DENKER, 1975). In den Uterusepithelzellen der Blastozystenumgebung verbleibt daraufhin kaum eine Arylamidaseaktivität, ganz im Gegensatz zu weiter von der Blastozyste entfernten Abschnitten des Endometriums oder zur Uterusschleimhaut pseudogravider Weibchen.
Es erschien uns nun interessant, daß wir einen solchen Abfall der Arylamidaseaktivität auch in der Umgebung von CuIUDs beobachteten, nicht jedoch im Fall von Kupfer-freien-IUDs.

Material und Methoden

Verwendet wurden IUDs, die in Form und Größe etwa implantationsbereiten Kaninchenblastozysten entsprachen, nämlich Kugeln von 4,5 mm Durchmesser. CuIUDs wurden aus geschmolzenem, chemisch reinem Kupfer (99,7 %, E. MERCK, Darmstadt, Nr. 2700) in einer Form gegossen. Nachdem ihre Oberfläche sorgfältig geglättet und gereinigt worden war, wurden sie autoklaviert. Ähnliche Kugeln wurden aus autoklavierter 2%iger wäßriger Agaroselösung unter sterilen Kautelen gegossen. Diese Agaroselösung wurde in einigen Fällen zunächst bei etwa 45 °C mit Kupferpulver (500 mg Cu pro Milliliter) oder mit verschiedenen Hormonen versetzt. Verwendet wurden folgende Konzentrationen von Hormonen: Östradiolbenzoat (0,1–0,2 mg/ml), Östradiol – 17 β (0,6 mg/ml), Östron (0,1 mg/ml), Östriol (0,2 mg/ml), Progesteron (5 mg/ml), 17α-Hydroxyprogesteron (0,9 mg/ml), 20α-Dihydroprogesteron (0,3 mg/ml), Testosteron (0,1 mg/ml), Hydrocortison (0,5 mg/ml), Acetylcholin (0,4 mg/ml), Adrenalin (0,4 mg/ml), Histamin (0,4 mg/ml), Prostaglandin F2α (0,4 mg/ml), Prostaglandin E2 (0,4 mg/ml), Choriongonadotropin (Prolan® Bayer) (20–170 I.U./ml).
Geschlechtsreife weibliche Kaninchen verschiedener Rassen und Kreuzungen wurden bei einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 : 12 Stunden mit standardisiertem Pelletfutter gehalten. Insgesamt 22 Weibchen wurden für den Versuch eingesetzt. Sie wurden jeweils mit 2 fertilen Böcken belegt. Genau 6 Tage post coitum (d p. c.) wurden sie unter Thiobarbiturat-Anästhesie laparotomiert, die Uteruswand wurde durch kleine Schnitte an der antimesometralen Seite eröffnet, und es wurden in jedes Uterushorn zwei bis drei IUDs eingeführt. 4 Tiere erhielten IUDs aus reinem Kupfer, davon wurden 2 zum Zeitpunkt 7 d p. c., 2 zum Zeitpunkt 8 d p. c. getötet. Bei einem Weibchen wurden Agarosekugeln mit Kupferspänen in den Uterus inseriert; dieses Tier wurde 8 d p. c. untersucht. 16 Weibchen erhielten hormonhaltige Agarosekugeln und wurden 7 d p. c. untersucht.
Zum jeweils angegebenen Zeitpunkt wurden die Tiere durch Genickschlag und Ausbluten getötet, die Uteri wurden schnell entnommen, zerteilt und mit flüssigem Stickstoff eingefroren. CuIUDs wurden aus den Uterusstücken zuvor entfernt, kupferfreie IUDs darin belassen. Die Arylaminaseaktivität wurde an 14 μm – Kryostatschnitten histochemisch nachgewiesen (Nativschnitte und gefriersubstituierte Schnitte, Substrate: L-Leucin-4-Methoxy-β-Naphthylamid und L-Leucin-β-Naphthylamid; vergl. DENKER, 1976; DENKER und STANGL, 1976).
Für die Untersuchung einer Hemmung der uterinen Arylamidase durch Cu^{++}-Ionen wurde Arylamidase-reiche Uterusspülflüssigkeit von einem Weibchen im Stadium 4 d p. c. gewonnen. Die Arylamidaseaktivität wurde mit Leucin-β-Naphthylamid als Substrat, mit oder ohne Zusatz verschiedener Konzentrationen von $CuSO_4$ (oder zur Kontrolle $MgSO_4$), getestet (zu den Einzelheiten des Vorgehens vgl. VAN HOORN und DENKER, 1975).

Ergebnisse

CuIUDs verursachten in allen Fällen einen vollständigen Verlust der Arylamidaseaktivität des Uterusepithels und -sekrets. Dieser Effekt beschränkte sich 7 d p. c. auf die nähere Umgebung der Kupferkugeln, während zwischen den IUDs (bzw. Blastozysten) gelegene Endometriumabschnitte noch deutliche Aktivität zeigten. Es fanden sich bei den beiden Tieren dieses Stadiums 6 bzw. 3 Blastozysten von normaler Größe, die die physiologische Verminderung der Arylamidaseaktivität im Uterusepithel ihrer Umgebung zeigten (vgl. DENKER, 1976) (Zahl der Gelbkörper: 7 + 7), die jedoch weniger deutlich war als im Fall der CuIUDs. Bei den 2 entsprechenden, 8 d p. c. getöteten Tieren hatte sich der Arylamidaseaktivitätsverlust über die ganze Länge des Uterus ausgebreitet. Blastozysten wurden nicht gefunden (Zahl der Gelbkörper: 7 bzw. 6). Ein weiteres Tier, das Agarosekugeln mit Kupferspänen erhalten hatte, zeigte im Gegensatz dazu auch 8 d p. c. noch eine wenn auch verminderte Enzymaktivität in den IUD-fernen Endometriumabschnitten, wie dies auch in der normalen Gravidität gefunden wird. In der Nachbarschaft der CuIUDs und der vier Blastozysten (Zahl der Gelbkörper: 10) fiel die Arylamidasereaktion aber negativ aus.

In allen beschriebenen Fällen war die (geringere) Arylamidaseaktivität der Stromazellen in der Umgebung der CuIUDs kaum vermindert, die des Myometriums nicht verändert.

In der Nachbarschaft der CuIUDs fand sich regelmäßig ein massives Leukozytenreiches Exsudat im Uteruslumen. Durch Untersuchungen anderer Autoren ist gesichert, daß dies auf einem spezifischen Kupfereffekt beruht; das Exsudat ist steril (vgl. TOBERT, 1975).

Im biochemischen Test ergab sich eine vollständige Hemmung der Uterussekret-Arylamidase durch 1×10^{-3} M $CuSO_4$ und eine 30%ige Hemmung durch 1×10^{-4} M $CuSO_4$. 1×10^{-5} M $CuSO_4$ bewirkte keine Änderung der Enzymaktivität. $MgSO_4$, das zur Kontrolle für einen evtl. Einfluß der Sulfationen getestet wurde, war in diesen Konzentrationen unter den verwendeten Bedingungen ohne Effekt.

Die getesteten hormonhaltigen IUDs verursachten keine dem CuIUD-Effekt vergleichbare Verminderung der Arylamidaseaktivität des Uterusepithels. Nur in dem den Kugeln unmittelbar anliegenden Cavumepithel fand sich unregelmäßig ein gewisser Aktivitätsabfall, der aber nicht abzusichern war. Einige der Hormone (z. B. Testosteron) verursachten einen Anstieg der Arylamidaseaktivität des subepithelialen Stromas.

Diskussion

Wie schon aus früheren Experimenten mit IUDs aus reiner Agarose (DENKER, 1976) hervorging, läßt sich der Arylamidaseaktivitätsverlust in der Umgebung von Blastozysten nicht durch mechanische Einwirkung erklären. Dies wird durch die hier beschriebenen Experimente mit hormonhaltigen IUDs bestätigt, die es außerdem fraglich erscheinen lassen, ob der Effekt der Blastozysten auf der Abgabe von Hormonen (Sexualsteroiden, Prostaglandinen o. ä.) beruht, was zunächst als möglich erschien (DENKER, 1976).

Der hier gezeigte starke Abfall der Enzymaktivität in der Umgebung von CuIUDs muß als spezifischer Kupfereffekt angesehen werden. Wie die biochemischen Tests

demonstrieren, wird endometriale Arylamidase durch Cu^{++}-Ionen direkt gehemmt. Auf der anderen Seite gibt es keinen Anhalt für das Vorkommen von Arylamidase-Inhibitoren in der Blastozyste (VAN HOORN, in Vorbereitung). Wir müssen daher davon ausgehen, daß dem Abfall der Arylamidaseaktivität in beiden Fällen verschiedene Mechanismen zugrunde liegen: Stimulation der Sekretion durch Blastozysten, Hemmung des Enzyms durch CuIUDs.

Zur pathophysiologischen Signifikanz der beschriebenen Effekte möchten wir folgende Hypothese diskutieren: Man darf davon ausgehen, daß die ungewöhnlich hohe Arylamidaseaktivität im Uterussekret, die einen scharfen Gipfel kurz vor der Implantation zeigt (um 1000–1500 mU/mg Protein, VAN HOORN, in Vorbereitung) eine Bedeutung für die Entwicklung der Blastozyste und/oder für die Implantationseinleitung hat. Man kann sich nun vorstellen, daß das Endometrium eine normale Entwicklung und Implantation des Keims nur dann ermöglicht, wenn es Arylamidase und andere essentielle Faktoren, die es unter Progesteroneinwirkung akkumuliert hat (KÜHNEL et al., 1971; VAN HOORN, in Vorbereitung), auf Grund einer lokalen Stimulierung durch die Blastozyste verstärkt sezerniert. Ist ein CuIUD anwesend, so geht die Arylamidaseaktivität durch direkte Enzymhemmung verloren, und das Endometrium wird „refraktär" und unfähig die angedeutete Art von Interaktion mit der Blastozyste einzugehen. Dies könnte eine wesentliche Rolle bei der Hemmwirkung der CuIUDs auf die Entwicklung der Blastozysten und die Implantation spielen. Andere Mechanismen, die für die Wirkung von IUDs vorgeschlagen worden sind (z. B. Hemmung von Progesteron-Rezeptoren, Verursachung einer Asynchronie zwischen Endometrium und Blastozyste) sind damit nicht ausgeschlossen, sondern wirken möglicherweise komplementär.

Danksagung

Wir danken herzlich unseren Kollegen Dr. Ulla MOOTZ und W. D. SCHULTZ für ihre Hilfe be den Laparotomien und bei der Herstellung der CuIUDs, Prof. Dr. Dr. W. KOBERG für die Erlaubnis, sein zahntechnisches Labor zu benutzen, und Frau Anneliese LEONHARDT, Fräulein Gerda BOHR und Fräulein Petra MÖLLER für ihre ausgezeichnete technische Assistenz. Prostaglandine wurden freundlicherweise von Dr. H. VORBRÜGGEN (Schering AG., Berlin) zur Verfügung gestellt. Diese Untersuchungen wurden durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft unterstützt (De 181/4).

Literatur

BEIER, H. M., W. KÜHNEL und G. PETRY: Morphologische und biochemische Befunde am pseudograviden Kaninchenendometrium nach gonadotroper Stimulierung. Verh. Anat. Ges. **66**, Anat. Anz. Suppl. **130**, 445–457 (1972).

BERGMEYER, H. U.: Methoden der enzymatischen Analyse. Dritte Auflage, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße 1974.

CHANG, C. C., and H. J. TATUM: Effect of intrauterine copper wire on resorption of fetuses in rats. Contraception **11**, 79–84 (1975).

DENKER, H. W.: Zur Enzym-Topochemie von Frühentwicklung und Implantation des Kaninchens. Thesis, Med. Fak. University of Marburg (Germany) 1969. Enzym-Topochemie von Frühentwicklung und Implantation des Kaninchens, III. Histochemie **25**, 344–360 (1971).

– Wechselbeziehungen zwischen Blastozyste und Endometrium bei der Implantation: Beeinflussung der endometrialen Aminosäure-Arylamidase-Aktivität durch die Blastozyste. Verh. Anat. Ges. **70**, Anat. Anz. Suppl. **140**, 839–847 (1976).

– 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. Society 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. Symps. Ges. f. Histochemie, Bozen 1974, Acta histochem. Suppl. **XVI**, 249–257 (1976).
Duncan, G. W., and R. G. Wheeler: Pharmacological and mechanical control of implantation. Biol. Reprod. **12**, 143–175 (1975).
Grundsell, H.: Effect of a copper IUD on the incorporation of (^{3}H)thymidine and (5-^{3}H) uridine into the endometrium of the rabbit during early pregnancy. J. Reprod. Fert. **42**, 447–458 (1975).
Van Hoorn, G.: Dissertation (in Vorbereitung).
– and H. W. Denker: Effect of the blastocyst on a uterine amino acid arylamidase in the rabbit. J. Reprod. Fert. **45**, 359–362 (1975).
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).
Larsson, B., R. Liedholm and B. Åstedt: Increased fibrinolytic activity in the endometrium of patients using copper-IUD (Gravigard). Int. J. Fertil **20**, 77–80 (1975).
Makino, T., K. Yoshinaga and R. O. Greep: The effect of intrauterine contraceptive device (IUD) on pregnancy in the rabbit. Fertil. Steril. **23**, 264–269 (1972).
Nutting, E. F., P. L. Hackett, L. A. Ranticelli, L. Daniel, W. J. Clarde and R. G. Wheeler: Uterine copper distribution in monkeys implanted with copper-carrying intrauterine devices. Fertil. Steril. **26**, 80–92 (1975).
– and M. R. Mueller: The effect of a copper intrauterine device during the early stages of pregnancy in the rabbit. Fertil. Steril. **26**, 838–844 (1975a).
– – The effect of a copper intrauterine device on the histology and progestational response in pregnant and immature rabbits. Fertil. Steril. **26**, 845–856 (1975b).
Petry, G., W. Kühnel und H. M. Beier: Untersuchungen zur hormonellen Regulation der Präimplantationsphase der Gravidität. I. Histologische, topochemische und biochemische Analysen am normalen Kaninchenuterus. Cytobiologie **2**, 1–32 (1970).
Shaw, S. T., R. W. Cihak and D. L. Moyer: Fibrin proteolysis in the monkey uterine cavity: variations with and without IUD. Nature (Lond.) **228**, 1097–1099 (1970).
Tobert, J. A.: Induction of deciduomata by intrauterine copper in the rabbit. J. Reprod. Fert. **45**, 197–200 (1975).

Anschrift der Verfasser: PD Dr. Dr. H. W. Denker und Prof. Dr. W. Kühnel, Abteilung Anatomie der RWTH Aachen, Melatener Straße 211, D - 5100 Aachen.