Verh. Anat. Ges. 73, S. 427–434 (1979)

H.-J. Gerdes und H.-W. Denker, Aachen:

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

Die strukturelle Entwicklung der Keimhüllen des Kaninchens vom Stadium der Blastozystenbildung bis zur Implantation

Summary

Rabbit blastocyst coverings: structural transformation between the stages of blastocyst formation and implantation

The extracellular coverings of rabbit blastocysts are not identical with the zona pellucida but are more complex structures. Previously published views of their composition and identification of their various layers were based exclusively on light microscopical investigations of total embryos or of paraffin or cryostat sections, and have been contradictory (Braden, Bacsich & Hamilton, Böving, Gothié, Denker, Kirchner). Therefore we performed a systematic light and electron microscopical and histochemical study of rabbit morulae and blastocysts of the stages 2½, 3½, 4, 4½, 5, 6, 6½, and 7½ days post coitum (d p.c.), using Araldite-embedded material.
The morula (2½ d p.c.) is surrounded by the **zona pellucida** and the **mucoprotein layer** (a strongly charged sulphomucin derived from the tubal secretion, characterized, in the electron microscope, by fine-fibrillary structure). The zona pellucida disappears at 4½ d p.c. not only as result of the expansion of the blastocyst but by dissolution which may be due to enzymes possibly derived from the trophoblast or the uterine secretion. Immediately thereafter, the zona is replaced by a new layer which is deposited between trophoblast and mucoprotein layer and which is composed of protein-rich mucosubstances with sulphate ester groups and sialic acid. We propose to call this new layer **"neozona"**. Until implantation, it reaches considerable dimensions. This layer has not been recognized before, or it has been misinterpreted as zona pellucida. Our morphological and histochemical observations suggest that the neozona derives at least in part from material which is extruded from the trophoblast. This unterlines a new aspect of the physiology of preimplantative trophoblast, i.e. its secretory activity.
From 6 d p.c. on, a third layer can be recognized, the **gloiolemma** (Böving) which derives from uterine secretion. It is located on the outside of the mucoprotein layer which by this way becomes the middle layer of late preimplantation blastocyst coverings.

Einleitung

Während der Furchungs- und frühen Blastozystenstadien ist der Embryo des Kaninchens von **extrazellulären Hüllen** umgeben, die nicht ohne weiteres mit der Zona pellucida menschlicher Keime gleichzusetzen sind. Sie sind vielmehr komplexer aufgebaut. Nach übereinstimmenden Ergebnissen früherer Untersuchungen bestehen die **Hüllen in Furchungsstadien** aus der **Zona pellucida,** die bereits im Follikel gebildet wird, und der **Mukoproteidschicht,** die während der Tubenpassage auf den wandernden Keim aufgelagert wird (Braden 1952, Böving 1957, 1963, Bacsich und Hamilton 1954, Denker 1970a und b). Die Vorstellungen über den chemischen und strukturellen Aufbau der **Hüllen der späteren Stadien** (Blastozyste vom 4. Tag

bis zur Implantation, 7. Tag) sind allerdings ebenso kontrovers wie die Ansichten über den Bau und die Bezeichnung ihrer einzelnen Schichten.

Die kontroversen Vorstellungen der verschiedenen Autoren haben ihren Ursprung u. a. in der Beobachtung, die ASSHETON schon 1895 machte, daß nämlich die Hüllen trotz der starken Dehnung, der sie durch die Expansion der Blastozyste unterworfen sind (der Blastozystendurchmesser vergrößert sich von ca. 0,5 mm im Stadium $4^1/_2$ Tage post coitum [d p. c.] auf immerhin ca. 5 mm am 7. Tag), ab dem 4. Tag in ihrer Gesamtdicke nahezu unverändert bleiben. BÖVING (1957, 1963) leitete daraus den Schluß ab, daß die Zona pellucida durch die Dehnung unter die Auflösungsgrenze des Lichtmikroskops gerät und die Hüllen zum Zeitpunkt der Implantation aus der verbleibenden Mukoproteidschicht und einer von außen aufgelagerten Schicht aus verdichtetem Uterussekret, dem **Glöolemma,** bestehen, die ihrerseits die durch die Dehnung bedingte Ausdünnung ausgleicht. DENKER (1970a und b) hält auf Grund histochemischer Untersuchungen eine Modifikation und Erweiterung dieser Vorstellungen für notwendig. Er beobachtet, daß ab 5 d p. c. auch in der Innenschicht der Hüllen Neuraminsäure nachweisbar wird, obwohl diese in der Mukoproteidschicht, die nach BÖVING zur Innenschicht werden soll, nicht vorkommt. Ferner betont er, daß sich die mechanischen Eigenschaften der Blastozytsenhüllen (Sprödigkeit) vom gleichen Zeitpunkt an deutlich ändern. Er hält daher die Vorstellung, daß die Hüllen präimplantativer Blastozysten aus zwei Schichten, Mukoproteidschicht und Glöolemma, bestehen, für nicht haltbar und kommt zu dem vorsichtigen Schluß, „daß das Material von Zona und Mukoproteidschicht, vielleicht zusammen mit Uterussekret und Sekreten des Trophoblasten, im Blastozystenstadium umgebaut und neu angeordnet wird" (DENKER 1970b, S. 293).

Die vereinzelten Angaben anderer Autoren führen keinesfalls zu mehr Klarheit, sondern sind voll von Widersprüchen. Für GOTHIÉ (1958) bestehen die Hüllen 4 d p. c. einzig aus der Mukoproteidschicht, für BACSICH und HAMILTON (1954) $5^1/_2$ d p. c. nur aus intakter Zona bei völligem Fehlen der Mukoproteidschicht. KIRCHNER (1973, 1975) beschreibt die Hüllen als mindestens zweischichtig mit Zona pellucida und Mukoproteidschicht, wobei Uterussekret als 3. Schicht außen aufgelagert sein kann. Als Erklärung für die unveränderte Dicke der Zona postuliert er Quellungsprozesse, denen chemische Veränderungen in dieser Schicht zugrunde liegen.

Die genannten Arbeiten stützen sich ausschließlich auf lichtmikroskopische Befunde und schließen z. T. nur ausgewählte Stadien der Entwicklung, nicht aber lückenlose Serien, ein. Wir haben daher die Stadien von der Morula bis zur sich implantierenden Blastozyste ($2^1/_2$, $3^1/_2$, 4, $4^1/_2$, 5, 6, $6^1/_2$, $7^1/_2$ Tage) einer systematischen histochemischen und morphologischen Untersuchung an Semidünnschnitten und im Elektronenmikroskop unterzogen, um eine eindeutige **Herleitung der einzelnen Schichten** zu ermöglichen. Dabei galt unsere besondere Aufmerksamkeit der **Bildung** und der **chemischen Umgestaltung** der einzelnen Schichten.

Material und Methoden

Geschlechtsreife weibliche Mischlingskaninchen wurden wie früher beschrieben (DENKER 1970a) gehalten, belegt und zum angegebenen Zeitpunkt post coitum (d p.c.) getötet, um die Embryonen durch Ausspülen des Genitaltraktes mit 0,9 % NaCl-Lösung zu gewinnen. Die Morulae und Blastozysten wurden sofort in 3,6 % Glutaraldehyd in 0,2 m Cacodylatpuffer *p*H 7,3 bei 0–4 °C 1 Std. lang fixiert, in demselben Puffer ausgewaschen und mit 2,5 % Osmiumtetroxyd in diesem Puffer 3 Std. nachfixiert. Anschließend Entwässerung mit Äthanol und Propylenoxyd und Einbettung in Araldit. Semidünnschnitte (1 μm) und Dünnschnitte wurden mit dem Reichert-Ultramikrotom OmU3 hergestellt. Die Dünnschnitte wurden mit Uranylacetat und Bleizitrat kontrastiert und am Philips-Elektronenmikroskop 300 bei 80 KV untersucht.

Für die **elektronenmikroskopische Darstellung von Mukosubstanzen** wurde den Fixierungslösungen Rutheniumrot (Endkonzentration 0,25 mg/ml) zugegeben (LUFT 1971a und b).
Für die **lichtmikroskopisch-histochemische Untersuchung der Mukosubstanzen** wurden Semidünnschnitte nach der Methode von LANE und EUROPA (1965) von Araldit befreit. Dabei ist zu beachten, daß es in einem gewissen Umfang zu einer alkalischen Hydrolyse einiger chemischer Bindungen in den zu untersuchenden Substanzen kommen kann. Histochemische Reaktionen: Mukosubstanzen: Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS) mit Kontrollen, Methylierungsreaktion, Toluidinblau-Färbung bei *p*H 1 und *p*H 3, Alcianblau-Färbung, Neuraminidase-Behandlung; Proteinfärbungen: Hg-Bromphenolblau-Färbung, Hydroxynaphthaldehyd-Reaktion (Literatur s. PEARSE 1968, DENKER 1970a, GERDES, in Vorbereitung).

Ergebnisse und Diskussion

Die **Morula (2$^1/_2$ d p. c.)** ist von der **Zona pellucida** und der Mukoproteidschicht umgeben. Die Zona wird, wie bereits erwähnt, im Follikel gebildet und stellt einen Komplex aus Proteinen und Mukosubstanzen dar. Die Mukosubstanzen enthalten sowohl anionische Gruppen – insbesondere Schwefelsäureester – als auch reichlich PAS-reagible OH-Gruppen. Im Elektronenmikroskop läßt sie sich als innengelegene, strukturlose und gleichmäßig elektronendichte Schicht leicht identifizieren (vgl. auch Abb. 1). Die **Mukoproteidschicht** ist ein feinfibrilläres, stark negativ geladenes Sulfomuzin aus verdichtetem Tubensekret, das bei der Toluidinblaufärbung eine stabile Metachromasie zeigt.
Nach dem **Übertritt des Keims in den Uterus** (3 d p. c.) werden Zona und Mukoproteidschicht einem **Umbau** unterzogen. Dabei zeigt die Zona die stärkeren Veränderungen in Form einer stark abgeschwächten PAS-Reaktion und einer starken Verringerung des Proteinanteils vorwiegend in den inneren Abschnitten. In der Mukoproteidschicht kommt es zu einer stärkeren PAS-Reaktion bei leichter Verringerung des Sulfatestergehaltes.
Am 4. Tag sind die Hüllen infolge der Expansion des Keims deutlich dünner geworden, aber nach wie vor 2schichtig. Die Mukoproteidschicht läßt zu diesem Zeitpunkt morphologisch und histochemisch noch keine Anzeichen für eine weitere Umgestaltung erkennen. Auch die **Zona** zeigt morphologisch kaum Veränderungen. Ihre **PAS-Reagibilität** hat allerdings drastisch abgenommen. Das folgende untersuchte Stadium **(4$^1/_2$ Tage)** zeigt dann, daß die chemischen Veränderungen dieser Schicht nicht in einem eigentlichen Umbau bestehen, sondern in einer **vollständigen Auflösung der Zona** zwischen dem 4. und 5. Tag enden. Lichtmikroskopisch ist dies wegen der ohnehin geringen Dicke der stark gedehnten Zona schwer zu verifizieren. Es zeigt sich jedoch eindeutig im Elektronenmikroskop (Abb. 2). **Unmittelbar nach der Auflösung** wird die Zona durch eine **neue Schicht** ersetzt, die zwischen Trophoblast und Mukoproteidschicht abgeschieden wird und aus proteinreichen Mukosubstanzen mit Schwefelsäureestergruppen, Neuraminsäure und reichlich PAS-reagiblen vicinalen OH-Gruppen besteht (Abb. 3). Das Anfangsmaterial der neuen Schicht erscheint oft neben den Resten der Zona. Es ist im Vergleich zu diesen weniger elektronendicht und grobgranulär und zeigt andeutungsweise fibrillenähnliche Strukturen.
Diese neue Schicht ist bisher nicht beschrieben oder irrtümlich als Zona pellucida angesehen worden. Da sie diese zu ersetzen scheint und am gleichen histologischen Ort auftritt, bezeichnen wir sie als **Neozona.**
Lichtmikroskopisch-histochemisch sind zwischen Trophoblastoberfläche und dieser in Bildung begriffenen Schicht **Granula** nachweisbar, die eine ähnliche Zusammensetzung zeigen wie das Material der Neozona. Wir schließen daher aus unseren Untersuchungen, daß die Neozona vermutlich zumindest zum Teil als **Sekretionsprodukt des Trophoblasten** aufzufassen ist. Damit ergibt sich ein neuer Aspekt in der Physiologie

Abb. 1. Trophoblast und Hüllen einer jungen Blastozyste des Kaninchens, 3½ d p.c., Rutheniumrot, EM, 5800×.
In der Abbildung ist zuoberst der Trophoblast (T) zu erkennen, darunter die relativ homogen erscheinende, nur mäßig elektronendichte Zona pellucida (Z). Die Mukoproteidschicht (M) bildet die äußere Lage der Blastozystenhüllen (unten). Sie ist charakterisiert durch ihren Aufbau aus konzentrisch angeordneten Fibrillen/Lamellen.

des **präimplantativen Trophoblasten,** nämlich seine **Fähigkeit zu sekretorischen Leistungen.** Die Mukoproteidschicht läßt auch in diesem Stadium kaum Anzeichen für eine Umgestaltung erkennen.

Am 5. Tag hat sich der Bau der Hüllen gegenüber den früheren Stadien grundlegend verändert (Abb. 3). Die Neozona hat stark an Volumen zugenommen. Ganz außen ist die Mukoproteidschicht eindeutig auf Grund ihrer konzentrischen Fibrillen zu erkennen. An der Grenze zwischen ihr und der Neozona jedoch scheint jetzt eine besondere Struktur zu existieren, die eine angedeutete konzentrische Streifung erkennen läßt, wie sie eigentlich typisch für die Mukoproteidschicht ist, deren Elektronendichte aber nach außen abnimmt und in den inneren Partien mit der der Neozona vergleichbar ist. Histochemisch ist dieser Abschnitt der Hüllen charakterisiert durch

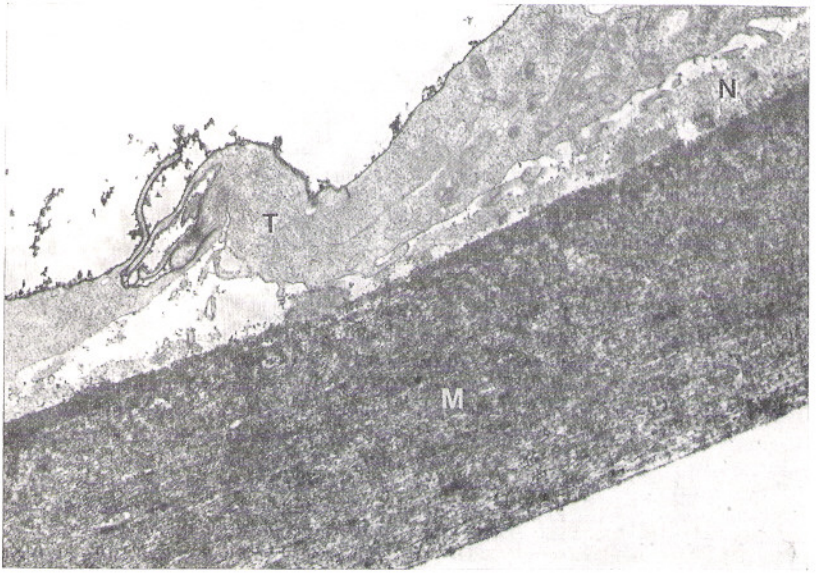

Abb. 2. Trophoblast und Blastozystenhüllen des Kaninchens, 4½ d p.c., Rutheniumrot, EM, 9500×.
Die Blastozystenhüllen bestehen fast ausschließlich aus der Mukoproteidschicht (M), die an ihrer typischen Struktur gut erkennbar ist. Zwischen ihr und dem Trophoblasten (T) sind kaum noch Reste der Zona pellucida nachweisbar. Stellenweise finden sich am ehemals von der Zona eingenommenen Ort dagegen lockere Aggregate granulären, relativ wenig kontrastierten Materials (N) (künftige Neozona?).

einen großen Reichtum an Proteinen und PAS-reagiblen OH-Gruppen sowie durch einen blauen Farbton in der Toluidinblaufärbung. Wir kommen auf Grund dieser Beobachtungen zu dem Schluß, daß es sich hier um die **inneren Abschnitte der Mukoproteidschicht** handelt, in die von innen her proteinreiches Material (Sekretmaterial des Trophoblasten?) **eingelagert** wurde, das durch die Maskierung saurer Gruppen in der Toluidinblaufärbung zu einem Verschwinden der Metachromasie dieser Abschnitte mit einem Ersatz durch einen blauen Farbton geführt hat. Daß etwa zum gleichen Zeitpunkt auch Uterussekretmaterial von außen in die Mukoproteidschicht eindringt, ist auf Grund bereits vorliegender anderer Untersuchungen (KIRCHNER 1973) zu vermuten.
Wir halten fest, daß die Keimhüllen 5 d p. c. weiterhin aus 2 Schichten bestehen: der Neozona und der Mukoproteidschicht, die ihrerseits zwar zumindest von innen her einem Umbau unterzogen wird, aber als Schicht erhalten bleibt.
Eine dritte Schicht, das **Glöolemma,** ließ sich in unseren Untersuchungen erstmals **6 d p. c.** nachweisen. Diese Schicht wird vom Endometrium auf die Mukoproteidschicht aufgelagert. Histochemisch zeigt sie eine Zusammensetzung aus Proteinen und Mukosubstanzen unter Beteiligung von Schwefelsäureestern, Neuraminsäure und PAS-reagiblen OH-Gruppen.
Zum Zeitpunkt des **Implantationsbeginns** (etwa 7 d p. c.) bestehen die Hüllen somit aus **3 Strukturen** unterschiedlicher Abstammung (Abb. 4): der **Neozona** aus verdichtetem Trophoblastsekret, der **Mukoproteidschicht** aus verdichtetem Tubensekret und dem **Glöolemma** aus verdichtetem Uterussekret. Die Schichtengliederung ist

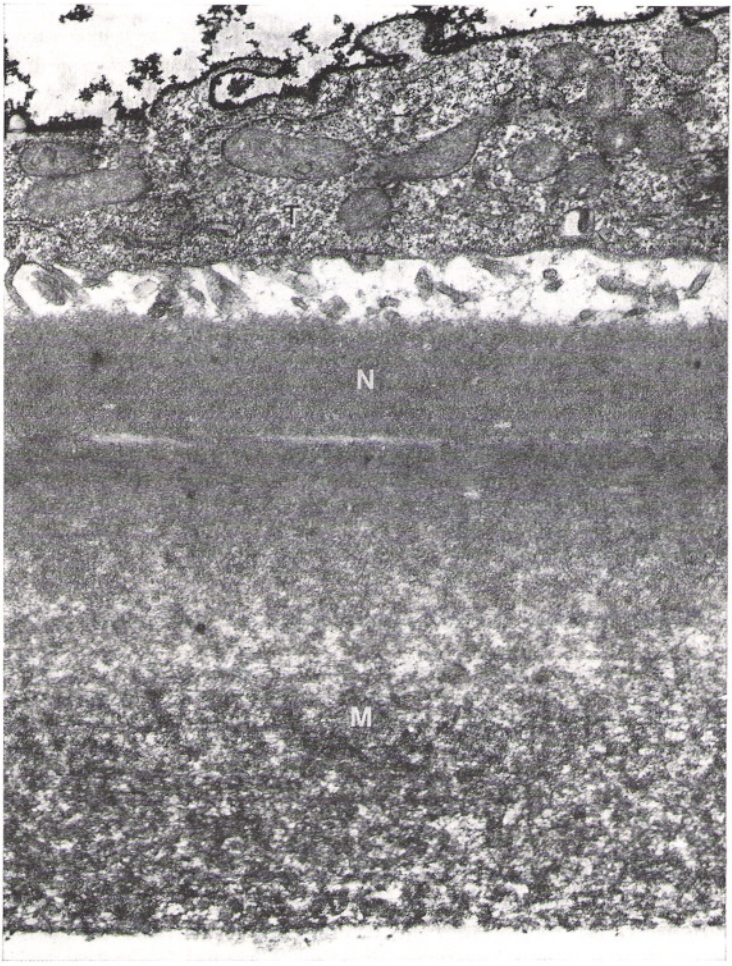

Abb. 3. Trophoblast und Blastozystenhüllen des Kaninchens, 5 d p.c., Rutheniumrot, EM, 12800×.
Der Aufbau der Blastozystenhüllen ist komplexer und schwerer analysierbar als in den vorausgegangenen Stadien. Außen (im Bild unten) ist die Mukoproteidschicht (M) an Hand ihrer typischen grobgranulär-fibrillären Struktur klar identifizierbar. Innen, zum Trophoblasten (T) zu, liegt die feingranulär-amorphe Neozona (N). Zwischen ihr und dem Trophoblasten finden sich flockige Präzipitate von ähnlicher Elektronendichte. Die Grenze der Neozona zur Mukoproteidschicht ist nicht eindeutig bestimmbar: feingranuläres Material scheint von innen (oben) her in diese einzudringen. In dieser Region erscheint die Struktur der Mukoproteidschicht dagegen aufgelockert.

sowohl auf dem Semidünnschnitt als auch im Elektronenmikroskop sehr auffällig; elektronenmikroskopisch wird sie in diesem Stadium sogar deutlicher ohne als mit Rutheniumrot-Vorbehandlung.
Die Umwandlung der Keimhüllen in den einzelnen Blastozystenstadien, die hier beschrieben worden ist, scheint nicht in normaler Weise zu erfolgen, wenn das uterine Milieu infolge von Eingriffen in den mütterlichen Sexualhormonhaushalt verändert ist (Beier 1974) oder wenn die Embryonen in vitro in uterusproteinfreien, lediglich

Abb. 4. Blastozystenhüllen des Kaninchens, 6½ d p.c., ohne Rutheniumrotzusatz, EM, 16600×. Deutlich lassen sich drei Schichten der Hüllen unterscheiden: Innen liegt die feingranulär-amorphe Neozona (N), in der Mitte die Mukoproteidschicht (M), außen das nur wenig elektronendichte, locker strukturierte Glöolemma (G) aus verdichtetem Uterussekret.

Rinderserumalbumin enthaltenden Gewebekulturmedien gehalten werden. Die Zona pellucida wird unter solchen Bedingungen nicht aufgelöst und behindert infolgedessen die Expansion der sich entwickelnden Blastozyste, bis diese Hüllenschicht dem sich verstärkenden Expansionsdruck nicht mehr standhalten kann und rupturiert (Beier und Mootz 1979, Denker und Maurer, in Vorbereitung). Darüber hinaus ist offenbar auch die weitergehende Transformation der Blastozystenhüllen, nämlich die Bildung der Neozona (und erwartungsgemäß auch die des Glöolemmas), in vitro bei Fehlen uteriner Faktoren gestört (Denker und Maurer, in Vorbereitung).

Die hier erstmals dargelegten Beobachtungen über die durchgreifende Umwandlung, die die Keimhüllen des Kaninchens im Blastozystenstadium durchmachen, scheinen uns von Bedeutung zu sein für die richtige Interpretation von Untersuchungen, in denen das Kaninchen als Modell verwendet wird, für das **Studium des Stoffaustausches** zwischen Keim und Mutter und für die Erforschung der **Biochemie der Keimhüllenauflösung** (Denker 1977) in der Anheftungsphase der Implantation.

Danksagung

Die Autoren danken Fräulein Gerda Bohr herzlich für ihre ausgezeichnete technische Assistenz, insbesondere bei der Herstellung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen. Diese Untersuchungen wurden in dankenswerter Weise von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt (De 181/7).

Literatur

Assheton, R.: A re-investigation into the early stages of the development of the rabbit. Quart. J. Microsc. Sci. (London) **37**, 113–164 (1895).

Bacsich, P., Hamilton, W. J.: Some observations on vitally stained rabbit ova with special reference to their albuminous coat. J. Embryol. exp. Morphol. **2**, 81–86 (1954).

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

Beier, H. M., Mootz, U.: Significance of maternal uterine proteins in the establishment of pregnancy. In: Ciba Symposium No. 64: Maternal Recognition of Pregnancy. Elsevier-Excerpta Medica: Amsterdam 1979 pp. 111–140.

Böving, B. G.: Rabbit egg coverings (Abstr.) Anat. Rec. **127**, 270 (1957).

Böving, B. G.: Implantation mechanisms. In: Conference on Physiological Mechanisms Concerned with Conception (C. G. Hartman, ed.). Pergamon Press: Oxford-London-New York-Paris 1963, pp. 321–396.

Braden, A. W. H.: Properties of the membranes of rat and rabbit eggs. Austral. J. Sci. Res., Ser. B **5**, 460–471 (1952).

Denker, H.-W.: Topochemie hochmolekularer Kohlenhydratsubstanzen in Frühentwicklung und Implantation des Kaninchens. I. Allgemeine Lokalisierung und Charakterisierung hochmolekularer Kohlenhydratsubstanzen in frühen Embryonalstadien. Zool. Jahrb. Physiol. **75**, 141–245 (1970a).

Denker, H.-W.: Topochemie hochmolekularer Kohlenhydratsubstanzen in Frühentwicklung und Implantation des Kaninchens. II. Beiträge zu entwicklungsphysiologischen Fragestellungen. Zool. Jahrb. Physiol. **75**, 246–308 (1970b).

Denker, H.-W.: Implantation: The Role of Proteinases, and Blockage of Implantation by Proteinase Inhibitors. Springer-Verlag: Berlin-Heidelberg-New York 1977 (= Adv. Anat. Embryol. Cell Biol. Vol. 53 Fasc. 5).

Denker, H.-W., Maurer, R. R.: The dynamic structure of rabbit blastocyst coverings. II. The influence of in vitro culture conditions (in Vorbereitung).

Gothié, S.: Contribution à l'étude de la membrane pellucide de l'oeuf de Lapine à l'aide du S^{35}. J. Physiol. (Paris) **50**, 293–294 (1958).

Kirchner, C.: Interferenzkontrastmikroskopische Untersuchungen über die Lysis der Keimhüllen beim Kaninchen. Cytobiologie **7**, 437–441 (1973).

Kirchner, C.: Vorbereitungen auf die Implantation beim Kaninchen. Verh. Deutsch. Zool. Ges. 1974. Gustav FischerVerlag: Stuttgart 1975, pp. 142–145.

Lane, B. P., Europa, D. L.: Differential staining of ultra-thin sections of epon-embedded tissues for light microscopy. J. Histochem. Cytochem. **13**, 579–582 (1965).

Luft, J. H.: Ruthenium red and violet. I. Chemistry, purification, methods of use for electron microscopy and mechanism of action. Anat. Rec. **171**, 347–368 (1971a).

Luft, J. H.: Ruthenium red and violet. II. Fine structural localization in animal tissues. Anat. Rec. **171**, 369–416 (1971b).

Pearse, A. G. E.: Histochemistry. Theoretical and Applied. Vol. I. J. & A. Churchill, Ltd.: London 1968.

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