Verh. Anat. Ges. 77, S. 421–423 (1983)

E. Meinshausen und H.-W. Denker

Abteilung Anatomie der Medizinischen Fakultät an der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen

Entwicklungsleistungen von Kaninchenembryonen trotz Hemmung der Anheftung in utero

Die Implantation des Embryos im Uterus wird beim Säugetier meist als Voraussetzung für eine über das Blastozystenstadium hinausgehende Entwicklung angesehen. Man denkt dabei nicht nur an die Erfordernisse des Stoffaustauschs durch die sich entwickelnde Plazenta hindurch, sondern z. T. sogar an eine unmittelbarere Bedeutung der Anheftung für die regelrechte Differenzierung des Embryos: Auch in der in-vitro-Kultur werden die besten Entwicklungsleistungen erreicht, wenn der Trophoblast sich an eine Matrix anheften kann (Hsu et al. 1974; Wiley et al. 1978).
Im Rahmen von Untersuchungen über die Beeinflussung der Implantation durch Proteinase-Inhibitoren haben wir dagegen Gelegenheit gehabt, eindrucksvolle Differenzierungsleistungen von Kaninchenembryonen trotz Verhinderung der Anheftung im Uterus zu beobachten. Grundkonzept ist bei diesen Versuchen die Hemmung der Blastolemmase, eines Schlüsselenzyms in der Einleitungsphase der Implantation beim Kaninchen, durch potente Proteinase-Inhibitoren wie Aprotinin (Trasylol®) (Denker 1977). Diese Hemmung kann sowohl durch einmalige, hochdosierte Injektion vor Implantationsbeginn erreicht werden, als auch durch kontinuierliche Infusion in das Uteruslumen.
In den vorliegenden Untersuchungen wurden graviden Kaninchen im Rahmen einer Laparotomie zum Zeitpunkt $5^1/_2$ Tage post coitum (d p. c.) auf osmotischer Basis arbeitende Alzet®-Minipumpen in das Uteruslumen knapp oberhalb der Cervix uteri eingesetzt (Meinshausen 1982). Auf diese Weise wurde eine kontinuierliche Infusion von 84 μg Aprotinin pro Stunde über mehrere Tage ermöglicht. Als Ergebnis der Hemmung von Blastolemmase blieben die extrazellulären Blastozystenhüllen zunächst im Gegensatz zu den Kontrollen unaufgelöst. Allerdings kam es zu einem späteren Zeitpunkt (etwa $8^1/_2$ d p. c.) noch dazu, daß die meisten Keime (75%) ihre Hüllen verloren. Offenbar geschah dies meist durch mechanische Sprengung, gelegentlich auch durch eine verspätete, unvollständige Lyse.
Besonders eindrucksvoll erscheinen jedoch die Embryonen (25%), die auch $9^1/_2$ d p. c. (d. i. $2^1/_2$ Tage, nachdem die Implantation in den Kontrollen begonnen hat) noch vollständig von Blastozystenhüllen umgeben gefunden wurden. Obwohl sie immer noch frei im Uteruslumen lagen und keinen Kontakt zum Uterusepithel gefunden hatten, war dennoch ein unter Umständen erheblicher Differenzierungsgrad erreicht: Neuralrohr, Somiten, Seitenplatten, Exocoelbildung sowie beginnende Amnionbildung (s. Abbildung). Ein solcher Keim ist im Vergleich zu normalen Kontroll-Embryonen nur geringfügig retardiert. Die embryonalen Gewebe erschienen morphologisch intakt. Nur im nicht-angehefteten Syncytiotrophoblasten wurden deutliche Degenerationszeichen erkennbar. So wurde auf Grund der Einwirkung des Proteinase-Inhibitors eine morphologische Situation erreicht, die zuvor in ähnlicher Weise nur bei Beuteltieren und beim Pferd gesehen worden ist: eine weit differenzierte, aber noch vollständig von extrazellulären Hüllen umgebene Keimblase.
Im Vorliegenden Fall war der Zeitpunkt, zu dem normalerweise die Obplazentabildung erfolgt und zu dem nach der Arrosion mütterlicher Kapillaren Plasmaproteine

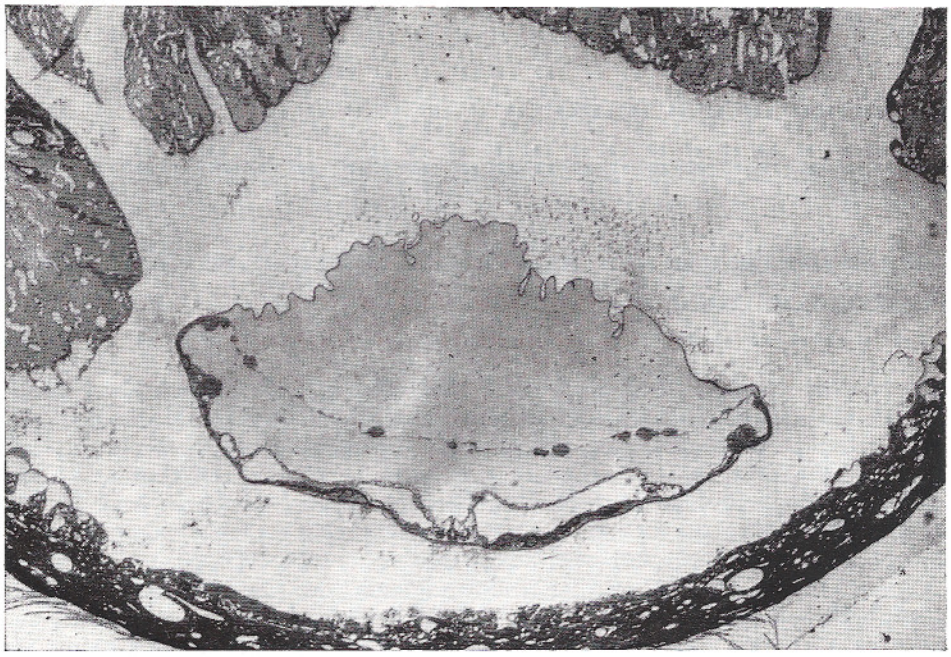

Abb. 1. Die permanente Anwesenheit effektiver Wirkspiegel des Proteinase-Inhibitors Aprotinin (Trasylol®) im Uteruslumen hat die physiologische Auflösung der extrazellulären Blastozystenhüllen verhindert. Diese Blastozyste liegt daher auch $9^1/_2$ d p. c. (d. i. $2^1/_2$ Tage nach dem Beginn der Implantation in den Kontrollen) noch völlig frei im Uteruslumen; eine Invasion des Trophoblasten ins Endometrium ist nicht möglich gewesen. Die Räume zwischen der Blastozystenoberfläche und dem Endometrium sind vermutlich infolge Schrumpfung bei der Entwässerung und Einbettung in Araldit artefiziell vergrößert. Die Blastozyste ist im Uterus invers orientiert: mit dem Embryonalpol zur antimesometralen Seite hin (unten). Semidünnschnitt, Toluidinblau, 17,5 ×

in das Blastozystenlumen einzuströmen beginnen, bereits um gut zwei Tage überschritten. Auch die mesometrale (definitive) Plazentabildung hätte schon einen Tag zuvor beginnen müssen. Die Frage, wieweit eine solche Embryonalentwicklung ohne Anheftung beim Kaninchen noch gehen kann, konnte in unseren Versuchen nicht genau geklärt werden. Bei Untersuchungen im Stadium $11^1/_2$ d p. c. fanden sich keine freien, aber dennoch entweder normal entwickelten oder nur retardierten Keime. Nach unseren Untersuchungen ist nach $8^1/_2$ d p. c. nicht mehr mit einer nur verspäteten, aber morphologisch unauffälligen Implantation zu rechnen. Möglicherweise hat sich bereits zu diesem Zeitpunkt das uterine Milieu so verändert, daß auch bei Entfernung der Inhibitorquelle eine normale Implantation nicht mehr gelingt.

Bei einigen Spezies (z. B. Maus) kann in Abhängigkeit vom hormonellen Status des Muttertieres eine Entwicklungsverzögerung (Diapause) der Blastozysten ausgelöst werden, die mit einem Ausbleiben der Implantation verbunden ist. Diese Korrelation hat zu der Vermutung geführt, daß der Fortgang der Differenzierung des Embryos und die Implantation über einen gemeinsamen Mechanismus reguliert werden. Für die Maus ist diese Vorstellung nur auf Grund von aufwendigen molekularbiologischen Untersuchungen erschüttert worden (Weitlauf und Kiessling 1981). Beim Kaninchen verfügen die Blastozysten nicht über ein Programm zum Eintritt in ein Diapause-Stadium. Bei dieser Spezies zeigen nun die geschilderten Untersuchungen deutlich, daß sich Implantation und Differenzierung des Embryos im Experiment voneinander dissoziieren lassen, d. h. daß sie getrennten Regulationen unterworfen sein müssen.

Literatur

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

HSU, Y.-C., BASKAR, J., STEVENS, L. C., RASH, J. E.: Development in vitro of mouse embryos from the two-cell egg stage to the early somite stage. J. Embryol. exp. Morph. **31**, 235–245 (1974)

MEINSHAUSEN, E.: Beeinflussung der Embryo-Implantation durch fortlaufende intrauterine Verabreichung eines Proteinaseinhibitors. Experimentelle Untersuchungen am Kaninchen. Dissertation, Med. Fak. RWTH Aachen, 1982

WILEY, L. M., SPINDLE, A. I., PEDERSEN, R. A.: Morphology of isolated mouse inner cell masses developing in vitro. Develop. Biol. **63**, 1–10 (1978)

WEITLAUF, H. M., KIESSLING, A. A.: Activation of "delayed implanting" mouse embryos in vitro. J. Reprod. Fert., Suppl. **29**, 191–202 (1981)

Anschrift: Dr. med. E. MEINSHAUSEN und Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. H.-W. DENKER, Abteilung Anatomie der Medizinischen Fakultät an der RWTH Aachen, Melatener Straße 211, D - 5100 Aachen.