

Aus der Universitäts-Frauenklinik Göttingen
(Direktor: Prof. Dr. H. Martius)
und der Universitäts-Frauenklinik Münster i. W.
(Direktor: Prof. Dr. W. Bickenbach)

Die hormonale Schwangerschaftsdiagnose mit dem Krallenfrosch¹

Von W. Bickenbach

Mit 6 Abbildungen

*Meinem hochverehrten Lehrer H. Martius
zum 60. Geburtstag am 2. 1. 1945 gewidmet*

In den letzten Jahren wurde besonders im englischen, aber auch im deutschen Schrifttum, ja schon in illustrierten Zeitungen der süd-afrikanische Krallen- oder Spornfrosch, der *Xenopus laevis* Daudin als Testobjekt für Schwangerschaftsreaktionen empfohlen (Elkan, Crew, Landgrebe, Lawes, Sachs, Neumann, Dosch). Es handelt sich um einen zu den Anuren gehörenden Aglossalen, der im tropischen Afrika bis herunter zum Kap lebt und seinen Namen der krallenartigen Endphalange der 1. bis 3. Zehe an den hinteren Extremitäten verdankt. Das Krallenfroschweibchen wird 7–10 cm lang und ist vom Männchen dadurch zu unterscheiden, daß seine Kloake von 3 Hautlappen umschlossen wird. Das Männchen bleibt etwas kleiner.



Abb. 1. Geschlechtsreifer weiblicher Krallenfrosch

Der *Xenopus laevis* Daudin ist ein reines Wassertier und kann in glattwandigen Aquarien gehalten werden. Er ist ein Lungenatmer und kommt zum Luftholen in kurzen Zeitabständen an die Wasseroberfläche.

1930 und 1931 fand Hogben, ein Zoologe in Kapstadt, daß die weiblichen Tiere auf Zufuhr von gonadotropem Hormon innerhalb weniger Stunden mit der Ablage zahlreicher Eier reagierten. 1934 zeigten Shapiro und Zwarenstein, daß das gonadotrope Hormon des Schwangerenharns dieselbe Wirkung hervorruft. Diese Eigenschaft des Krallenfrosches läßt sich mit Vorteil zur Schwangerschaftsdiagnose aus dem Harn heranziehen. Der Test besteht darin, daß man geschlechtsreifen weiblichen Tieren 1 bis 2 ccm Harn oder noch besser ein durch Azetonfällung hergestelltes Konzentrat des Harnprolans vom Oberschenkel des Hinterbeines aus unter die Rückenhaut in den dorsalen Lymphsack einspritzt. Bei positivem Ausfall

¹ Der experimentelle Teil der Arbeit wurde auszugsweise auf der Sitzung der Medizinischen Gesellschaft in Göttingen am 13. Juli 1944 vorgetragen.

der Reaktion kommt es schon nach 6–10 Stunden zur Ablage einer großen Zahl von Eiern (Abb. 2 u. 3).

Wie im Mäuseversuch verwendet man am besten Nüchternbarn, der bei alkalischer Reaktion mit 3%iger Essigsäure leicht angesäuert werden muß. Das spezifische Gewicht des Harns soll mindestens 1020 betragen. Sonst kann der Prolangehalt zu gering sein. Zur Azetonfällung des Wirkstoffs werden 100 ccm Harn mit 400–500 ccm chemisch-reinen¹ Azetons bis zum Maximum der Fällung versetzt. Der Niederschlag wird abzentrifugiert und von der Flüssigkeit

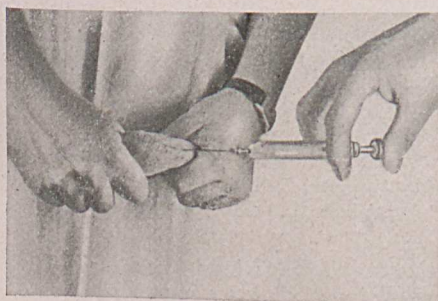


Abb. 2. Einspritzen des Prolans. Wegen der starken Schleimabsonderung wird das Tier in einem Gazetuch gehalten

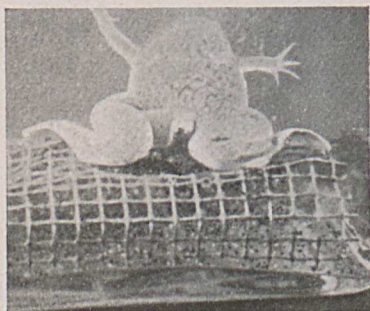


Abb. 3. Positiver Ausfall des Testes. Unter dem Drahtnetz sieht man zahlreiche Eier

getrennt. Dann wird nochmals die 2–3fache Azetonmenge hinzugegeben. Es wird wieder zentrifugiert und der gesamte Niederschlag dann zur Verdrängung des Azetons mit Äther behandelt. Nach Verdunsten des Äthers wird der Rückstand in 5 ccm sterilem Leitungswasser aufgenommen, eine halbe bis eine Stunde geschüttelt und filtriert. 1 ccm der Lösung enthält so das Prolan aus 20 ccm Harn. Wenn die injizierte Lösung nicht frei von Azeton und Äther ist, gehen die Tiere unter starker Schleimabsonderung und Krämpfen zugrunde. Für jeden Versuch nimmt man am besten 3–5 Krallenfrösche.

Da die Reaktion schon in 6–10 Stunden abgelesen werden kann, ist der wesentlichste Vorteil des Xenopustestes seine große Schnelligkeit, die von keiner anderen Methode erreicht wird. Der klassische Mäuseversuch nach Aschheim und Zondek war wegen seiner Dauer von etwa 8 Tagen schon immer für die Kliniker unhandlich. Die aus ihm abgeleiteten Schnellreaktionen (Brühl, Hollstein u. a.) haben sich nicht eingeführt. Der Friedmannsche Kaninchenversuch ist durch die vor der Injektion vorzunehmende Probelaparotomie zu umständlich.

Ein weiterer Vorteil des Xenopustestes besteht darin, daß die zum Versuch benutzten Tiere nicht getötet zu werden brauchen, sondern bei negativem Reaktionsausfall schon nach 14 Tagen, bei positivem Ergebnis nach 4–6 Wochen erneut für einen Versuch zu benutzen sind. Hierdurch kann der Tierbestand verhältnismäßig niedrig gehalten werden.

Die Wartung der zum Test verwendeten Frösche ist sehr einfach. Es genügen glatte Glasgefäße oder gemauerte Becken, die so groß sein müssen, daß die Tiere frei umherschwimmen können. Wasserpflanzen, künstliche

¹ Das Azeton muß, wenn es chemisch-rein nicht vorhanden ist, unter Zugabe von Kalziumchlorid 2 mal bei 56° überdestilliert sein.

Inseln oder Bodenschlupfwinkeln sind nicht unbedingt notwendig; sie erschweren nur die Reinigung der Aquarien. Eine zu dichte Belegung der Wohnbecken ist nicht zu empfehlen, da die Tiere keine Nahrung zu sich nehmen, wenn sie sich nicht frei bewegen können. Die geschlechtsreifen Krallenfrösche vertragen Wassertemperaturen von 5–28° C. Auch im Winter sind für die erwachsenen Tiere zusätzliche Heizanlagen nicht erforderlich, wenn man die Aquarien in tagsüber geheizten Räumen unterbringt. In der Pflege ist der Krallenfrosch recht anspruchslos. 2–3mal pro Woche, etwa 4–6 Stunden nach der Fütterung, wird das Wasser gewechselt und das Aquarium gereinigt. Eine Schwierigkeit besteht gegenwärtig darin, daß der *Xenopus* ein ziemlich gefräßiger und anspruchsvoller Fleischfresser ist. In der Freiheit lebt er von Regenwürmern und Wassertieren, die in den notwendigen Mengen von uns aber nicht zu beschaffen waren. Nach dem zoologischen Schrifttum soll das Tier in der Gefangenschaft Kalbsleber und zartes Muskelfleisch als Futter erhalten. Da das einzelne Tier pro Woche etwa 20 g rohes Fleisch braucht, müßten bei einem Tierbestand von 300–500 Fröschen, wie er für ein Laboratorium mit monatlich 30–60 Schwangerschaftsreaktionen notwendig ist, wöchentlich 6–10 kg Fleisch bereitgestellt werden. Gegenwärtig verfüttere ich die verschiedensten Arten von Würmern.

Der Hauptnachteil des *Xenopustestes* liegt bis jetzt aber darin, daß die Tiere in Deutschland nicht im Handel sind. Es gibt nur wenige Exemplare bei Liebhabern von Wassertieren, in Instituten, Kliniken und einzelnen Industrielaboratorien. Die Engländer ließen die Krallenfrösche vor dem Kriege zu Tausenden in Südafrika fangen und importierten sie für 8 Pence das Stück. Man befürchtete schon, daß der in Teichen und Tümpeln lebende *Xenopus* bald in seiner Heimat ausgerottet sein würde. Größere Zuchtanstalten oder -farmen gibt es noch nicht; ihrer Anlage schienen sich erhebliche Schwierigkeiten entgegenzustellen. Die Verwendung der durch Prolan provozierten Eiablage als Schwangerschaftstest setzt ja voraus, daß spontane Ovipositionen nicht erfolgen. Vielfach wird auch im Schrifttum angenommen, daß das Tier in der Gefangenschaft gar nicht oder nur selten ovuliere und sich nicht fortpflanze (Landgrebe, Crew, Elkan, Lawes). Damit wäre aber auch eine systematische Aufzucht, wenigstens in Europa, unmöglich. Die Angabe über das Ausbleiben spontaner Ovipositionen ist nur insofern richtig, als anscheinend Eiablagen im allgemeinen nur bei getrennter Haltung der Geschlechter und bei ungenügender Wartung nicht erfolgen. Bles beschrieb aber schon 1906, daß er durch plötzliche Erniedrigung der Wassertemperatur den Spornfrosch zur Kopulation und Ablage befruchteter Eier gebracht habe. Diese etwas merkwürdige Wirkung der Abkühlung hängt wahrscheinlich damit zusammen, daß die Tiere in der Freiheit laichen, wenn das Wasser, in dem sie leben, durch Regengüsse kälter geworden ist. Die Junglarven sind gegen höhere Temperaturen als 28–30° C sehr empfindlich. Die Laichzeit liegt in der Heimat zwischen April und August, also in dem klimatischen Winter der südlichen Erdhälfte. Auch andere Untersucher haben schon über meist zufällige Fortpflanzungen in der Gefangenschaft berichtet. Dietel und Sieckmann teilten 1941 auf der 26. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie mit, daß ihnen die Aufzucht eines einzigen Tieres gelungen sei, und Dosch sah 1944 eine große Zahl von spontanen Laichablagen bei seinen Krallenfroschweibchen in der Zeit von Mitte Januar bis Mitte März, obwohl die Weibchen von den Männchen getrennt gehalten wurden. Es besteht also kein Zweifel, daß unter bestimmten, noch nicht eindeutig definierten Be-

dingungen die Ablage befruchteter Eier auch in der Gefangenschaft zu erzielen ist. Damit sind die Grundlagen für eine systematische Aufzucht gegeben. Um sie haben sich in den letzten Jahren in Europa Gasche (Basel), Dosch, die Asid-Werke und der Verfasser bemüht. Die Krallenfrösche können durch gleichzeitige Einspritzung von etwa 50–100 Ratteneinheiten gonadotropen Hormons aus Plazenta oder Hypophyse bei Männchen und Weibchen zu jeder Jahreszeit zur Kopulation und Ablage befruchteter Eier gebracht werden. Allerdings verlangt die Aufzucht der sich aus den Eiern entwickelnden Larven viel Mühe.

Zunächst ist unbedingt nötig, die Wassertemperatur der Zuchtbecken durch automatische Temperaturregler zwischen 21 und 24 Grad konstant zu erhalten. Am besten geschieht das durch eine Beheizung des

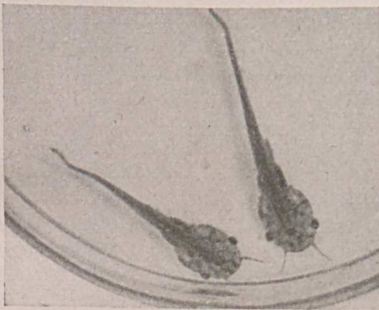


Abb. 4. Larven des *Xenopus laevis* Daudin im Alter von 4 Wochen



Abb. 5. *Xenopus laevis* Daudin in der Metamorphose

ganzen Raumes, in dem die Aquarien untergebracht sind. Wir verwenden dazu eine Regleranlage mit Kontaktthermometern von Klinger & Schmidt in Ilmenau (Thür.). Nach verschiedenen anderen Versuchen mit Fischfutter, Bäckerhefe usw. hat sich uns als Larvenfutter, einem Vorschlag von Gasche entsprechend, feinst zermahlenes Brennesselpulver als das beste erwiesen. Es wird als »Pulvis subtilissime paratus« verwendet und in einer wässrigen Aufschwemmung durch ein Gazesieb täglich in einer Menge von einigen Gramm in das Zuchtbecken gegossen. Die Anwendung eines größeren Pulvers führt zur Verstopfung des Reusenapparates der Larven, so daß sie zugrunde gehen. Das Futter muß trocken aufbewahrt werden. Die Fütterung beginnt etwa am 6. bis 7. Tag nach dem Schlüpfen der Larven, wenn diese anfangen, Saugbewegungen zu machen. Sie wird ausgesetzt, wenn das Schwanzende während der Metamorphose anfängt, sich abzubiegen. Ist der Schwanz aufgesaugt, so ist die Metamorphose beendet, und die Tiere erhalten nunmehr rohe Leber in feinstzerriebenem Zustand (Abb. 4 u. 5). Für die Wartung der Larven ist weiter wichtig, daß das Wasser täglich gewechselt und das Becken sehr sauber gehalten wird. Die Larven sind empfindlich gegen Temperaturschwankungen. Sie müssen nach dem Alter getrennt in gesonderten Aquarien untergebracht werden. Einzelheiten der Aufzucht sind in der Dissertation von Lindemann oder bei Gasche nachzulesen. Dieser konnte die Sterblichkeit bei der Aufzucht der Larven auf weniger als 2% herabdrücken. Die unsrige liegt allerdings noch wesentlich höher. Immerhin verfügten wir nach fünfmonatigen Zuchtversuchen bereits über einen Bestand von selbstgezogenen Jungfröschen.

Die Weibchen sind nach 8–12 Monaten geschlechtsreif und dann für den Schwangerschaftstest verwendbar.

Larven und Jungtiere werden ebenso wie die erwachsenen Frösche in einem abgedunkelten Raum gehalten, in dem sie einer direkten Sonnenbestrahlung nicht ausgesetzt sind. Der Krallenfrosch ist ein Dämmerungstier (siehe auch Kotthaus) und lebt nicht gern in grellem Licht. Die Larven können bei zu starker Belichtung sogar zugrunde gehen. Im ganzen verlangt die Aufzucht viel Geduld, viel Einfühlungsvermögen und Liebe zur Sache, während die Wartung und Pflege der erwachsenen Krallenfrösche erheblich weniger Umstände macht.

Es fragt sich nun, ob die Schwierigkeit der Aufzucht in einem entsprechenden Verhältnis zur Zuverlässigkeit des Testes stehen. Im englischen Schrifttum ist bis 1940 über 639 Schwangerschaftsproben mit 7 Fehlergebnissen berichtet worden (Landgrebe, Elkan). Der erste stellte 279 Versuche an und sah 6 fehlerhafte Ergebnisse. 5 mal fiel der Xenopustest negativ aus, während der gleichzeitig angestellte Mäuseversuch ein positives Ergebnis hatte. Einmal war der Mäuseversuch negativ und der Xenopustest positiv. Elkan schreibt, daß er unter seinen 360 Fällen 1 Fehldiagnose mit negativem Ausfall der Reaktion trotz bestehender Schwangerschaft gesehen habe. Danach entspräche die Zuverlässigkeit des Testes etwa derjenigen des Mäuseversuchs nach Aschheim und Zondek. Die im deutschen Schrifttum angegebene Zahl von Versuchen ist noch zu gering, um Schlußfolgerungen zu ziehen. Wir selbst beobachteten bei Verwendung nur je eines Tieres pro Versuch unter 38 Reaktionen 4 mal das Ausbleiben einer Eiablage nach Einspritzung von Prolan, 34 mal stimmte der Ausfall der Reaktion mit dem klinischen Befund überein. Ein Versager war auf einen technischen Fehler bei der Extraktion des Prolantrockenpulvers zurückzuführen, ist also vermeidbar und hängt nicht mit einer besonders unempfindlichen Phase des betreffenden Versuchstieres zusammen. Von den 38 Versuchen wurden 8 mit dem Harn nichtschwangerer Frauen, bei denen der Verdacht einer Tubargravidität bestand, angestellt. Der Test fiel negativ aus.

Die Zuverlässigkeit der Probe wird aber erheblich durch das von Dosch beobachtete Auftreten von 23 spontanen Laichablagen bei 8 seiner 9 Weibchen in der Zeit von Mitte Januar bis Mitte März 1944 in Frage gestellt. Auch ich sah bei meinen Tieren mehrfach spontane Ovipositionen. Es ist auffällig, daß sämtliche englische Autoren, die mit dem Test gearbeitet haben, keine spontanen Eiablagen beobachteten. Dosch sieht den Grund für diese von der seinen abweichenden Beobachtung darin, daß es sich bei den in England verwendeten Tieren um solche handelte, die in der Freiheit aufgewachsen und nun durch die Bedingungen der Gefangenschaft in ihrer Vitalität herabgesetzt waren. Aus einigen Angaben kann man schließen, daß die Tiere außerdem nicht gut gepflegt wurden. So erwähnt Crew, daß einzelne Tiere bis zu 5 Monaten am Leben blieben. Nach unseren Erfahrungen und denen anderer (z. B. Dosch) ist der Krallenfrosch aber viel zählebiger. Wir pflegen die eigenen Alttiere ohne Verluste seit mehr als 3 Jahren und haben sie übernommen, als sie schon 1–2 Jahre alt waren. Der Frosch kann also bei ausreichender Wartung jahrelang am Leben bleiben. Ich sehe wie Dosch die Ursache für die beobachteten spontanen Eiablagen in Anpassungserscheinungen an die Bedingungen der Gefangenschaft.

Ich möchte auf Grund eigener Erfahrungen einen anderen Weg vorschlagen, um die spontanen Ovipositionen zu unterdrücken. Ich habe dem

Tierfutter Follikelhormon beigemischt. Dieses hat bekanntlich eine hemmende Wirkung auf die Hypophyse. Bei dem hypophysenempfindlichen Krallenfrosch bleiben dann, wie eine mehrjährige Beobachtung jetzt lehrt, mit Sicherheit die spontanen Eiablagen aus, offenbar deswegen, weil das Follikelhormon die Ausscheidung von Follikelreifungshormon verhindert. Dieses Vorgehen hat den Vorteil, daß es exakt dosierbar ist, während die von Dosch vorgeschlagene Verschlechterung der Umweltbedingungen sich meßbar kaum abstufen läßt. Nach unseren bisherigen allerdings noch nicht endgültigen Erfahrungen genügt es, wenn das einzelne weibliche Tier mit dem Futter etwa 20–40 ME Follikelhormon pro Woche per os aufnimmt. Es ist möglich, daß diese Dosis bei längerer Verabreichung noch zu hoch ist.



Abb. 6. 2 Krallenfrösche aus derselben Eiablage im Alter von 4 Monaten. Der linke ist nach der Metamorphose mit roher Leber gefüttert worden und 3,4 cm lang (von der Kloake bis zur Schnauzenspitze gemessen), der rechte hat nach der Metamorphose Plazentagewebe erhalten; er hatte die Metamorphose gleichzeitig beendet. Seine Länge beträgt 1,9 cm! Die fotografierten Tiere entsprechen der Mittelgröße jeder Serie.

Die Kriegs- und Nachkriegsverhältnisse erlaubten an unserem Tiermaterial noch keine eindeutigen Feststellungen in dieser Richtung.

Die Hypophysenempfindlichkeit der Krallenfrösche gegen Follikelhormon geht auch daraus hervor, daß durch Verfütterung desselben an noch wachsende Tiere leicht eine Wachstumsverzögerung und Zwergwuchs erzeugt werden kann (Abb. 6).

Andererseits muß man aber folgern, daß durch übermäßige Follikelhormonzufuhr auch die Empfindlichkeit des Krallenfrosches gegenüber Prolan so herabgesetzt werden kann, daß hierdurch der Reaktionsausfall beeinträchtigt wird. Aus dem Grunde haben wir einstweilen bei unseren diagnostischen Versuchen nicht Naturharn, sondern konzentrierte Prolanlösungen, die durch Azetonfällung des Harnes gewonnen waren, verwendet (S. 33). Außerdem wird aber die Reaktionsempfindlichkeit der Krallenfrösche sicher noch von der Jahres- bzw. Laichzeit und der Wassertemperatur abhängig sein. Über diese quantitativen Verhältnisse läßt sich zunächst nichts aussagen. Zu ihrer genaueren Untersuchung ist eine größere Anzahl von in der Gefangenschaft gezogenen Fröschen nötig, als bis jetzt zur Verfügung steht.

Zusammenfassung

Über die endgültige Bewährung des Xenopustestes für die Schwangerschaftsdiagnose läßt sich noch nichts Sicheres sagen, besonders wenn in Deutschland gezogene Frösche verwendet werden. Zur weiteren Klärung ist es zunächst am wichtigsten, größere Zuchten anzulegen, um Erfahrungen zu sammeln und gegebenenfalls durch Modifikationen die Brauchbarkeit des Testes zu steigern. Es ist aber anzunehmen, daß es auf irgendeine Weise gelingen wird, die außerordentlich schnelle Reaktionsfähigkeit der Tiere der Klinik nutzbar zu machen, ohne auf die Zuverlässigkeit des klassischen Mäuseversuchs nach Aschheim und Zondek zu verzichten. Einer der möglichen Wege stellt die Vorbehandlung der Krallenfrösche mit Follikelhormon dar, wodurch sich beim erwachsenen Tier nach unseren bisherigen Erfahrungen spontane Eiablagen verhindern lassen.

Schrifttum

Allen u. Doisy, zit. nach Bomskov, Methodik der Hormonforschung Bd. II, 152, Leipzig 1939. — Bles, *Transact. Roy. Soc. Edinb.* **41**, 789 (1906). — Brühl u. Hollstein, *Arch. Gynäk.* **154**, 604 (1933). — Crew, *Brit. med. Journ.* **1939**, 766. — Dösch, *Wiener med. Wschr.* **1944**, 245. — Elkan, *Brit. medic. Journ.* **2**, 1253 (1938); *Presse med.* **16**, 308 (1939). — Fromme, C. A., *Inaug.-Diss. Göttingen* 1935. — Gasche, *Revue de Suisse de Zool.* **50**, 262 (1943).; *Natur u. Volk* **74**, Heft 1/2 (1944). — Hogben, *Proc. Roy. Soc. P. A.* **1930**; *Journ. exp. Biol.* **8**, 345 (1931). — Kotthaus, *Blätter für Aquarien- u. Terrarienkunde* **44**, 59 (1933). — Landgrebe, *Zs. exp. Biol.* **16**, 89 (1939). — Laves, *Dtsch. med. Wschr.* **1940**, 5. — Lindemann, *Inaug.-Diss. Göttingen* 1944. — Neumann, *Schwangerschaftsnachweis mit dem Xenopus laevis*. Vortrag, gehalten vor der Wiener Ärzteschaft. — Sachs, *Münch. med. Wschr.* **1939**, 1309. — Shapiro u. Zwarenstein, *Nature* **133**, 762 (1933). — Sieckmann, u. Diétel, *Arch. Gynäk.* **173**, 158 (1942).

Aus der Geburtshilflich-gynäkologischen Abteilung des Städtischen
Auguste-Viktoria-Krankenhauses Berlin-Schöneberg
(Dirig. Arzt: Prof. Dr. Carl Ruge)

Der Mechanismus der Eiabnahme im Laparoskop

Von Doz. Dr. Reinhold Elert

Mit 2 Abbildungen

Bezüglich des Mechanismus des Eitransportes aus dem Ovarium in die Tube ist man lange auf Mutmaßungen angewiesen gewesen, ehe es gelungen ist, durch direkte Beobachtung in vivo Klärung zu schaffen. Bis vor nicht allzulanger Zeit hat man angenommen, daß das Ei zusammen mit der Follikelflüssigkeit in die freie Bauchhöhle gelangt und durch die Darmperistaltik in den Douglasschen Raum transportiert wird, in dessen Flüssigkeit die Tuben mit ihren Fimbrienenden wie zwei Reusen eintauchen und das Ei durch Aspiration auffischen. Nach dieser Auffassung, die weder dem Eierstock noch dem Eileiter eine aktive Rolle bei der Eiaufnahme zuerkennt, bedeutet es fast einen Zufall, wenn das Ei nach Freiwerden aus dem Follikel seinen Weg in das Tubenostium findet.