

Aus dem Department of Pathology, Dartmouth Medical School Hanover,
New Hampshire, USA

**Immunohistologische Untersuchungen
zur Lokalisation des Relaxins in menschlicher Placenta und Decidua***

Von

F. D. DALLENBACH und G. DALLENBACH-HELLWEG

Mit 8 Textabbildungen

(Eingegangen am 9. September 1963)

HISAW (1926) hat als erster nachgewiesen, daß die bei Mensch und Säugetier seit längerem bekannte Symphysenerschlaffung vor und während der Geburt beim Meerschweinchen durch ein im Blutserum enthaltenes Hormon mit relaxierender Wirkung zustandekommt. Dieses später als Relaxin bezeichnete Hormon wurde dann in größeren Mengen vor allem im Ovar des schwangeren Schweines (ALBERT et al. 1947; HISAW und ZARROW 1948), im Uterus des Meerschweinchens (ZARROW 1948), in der Kaninchenplacenta (ZARROW 1949) und in der Decidua des Schafes (CASSANO et al. 1952) nachgewiesen. Im Blutserum der schwangeren Frau fanden als erste POMMERENKE (1934) und ABRAMSON et al. (1937) einen Gehalt an Relaxin. ZARROW et al. (1955) wiesen im Schwangerenserum 0,2 GPU/ml Relaxin in der 7.—10. Schwangerschaftswoche und 2 GPU/ml von der 38. bis 42. Woche nach, im Placentargewebe 0,5—4,0 GPU/g. Die in den letzten 35 Jahren durchgeführten zahlreichen Untersuchungen über Vorkommen, chemische Zusammensetzung und Funktion des Relaxins bei Mensch und Tier sind mit umfangreicher Literatur in Übersichtsarbeiten gut zusammengefaßt (s. vor allem HISAW und ZARROW 1950; SHER und MARTIN 1956; STEINETZ et al. 1959; STONE 1959). So konnte auch die chemische Struktur des Relaxins kürzlich weitgehend aufgeklärt werden (COHEN 1963; FRIEDEN 1963). Über die Funktion des Relaxins gehen die Meinungen noch so weit auseinander, daß es von kritischen Klinikern therapeutisch nicht verwandt wird. Der Bildungsort des Relaxins im Gewebe ist bis heute unbekannt. Da es sich um ein Eiweißhormon mit bekannter Antigenizität (COHEN) handelt, haben wir versucht, Relaxin in den es enthaltenden Geweben bei Mensch und Tier fluoreszenzmikroskopisch nachzuweisen. Im folgenden soll zunächst über unsere Untersuchungen am menschlichen Gewebe berichtet werden.

Material und Methode

1. Immunisierung der Tiere. Drei jungen Kaninchen von $2\frac{1}{2}$ — $3\frac{1}{2}$ kg Körpergewicht wurde zunächst Blut zur Gewinnung von normalem Kontrollserum entnommen. Sie bekamen danach intramuskulär jeweils an mehreren Stellen zwischen den Schulterblättern und in den Glutaeus maximus eine Relaxinlösung injiziert, die in folgender Weise hergestellt war: Chemisch weitgehend gereinigtes und für wissenschaftliche Zwecke standardisiertes Relaxin der Warner-Lambert Research Laboratories (STEINETZ 1963)¹ wurde in destilliertem

* Diese Arbeit wurde mit Mitteln des United States Public Health Service, Grant AI-04122—02 und GM-09472—02 durchgeführt.

¹ Für die Überlassung des Relaxins sind wir Dr. COHEN, Princeton, N. J. (USA) zu Dank verpflichtet.

Wasser bis zu einer Konzentration von 25 mg/ml gelöst und dann mit dem gleichen Volumen von Freunds Adjuvans (Difco, Detroit) emulgiert. Bei der ersten Injektion erhielt Kaninchen A insgesamt 26 mg Relaxin, Kaninchen B 53 mg und Kaninchen C 106 mg. 40 Tage danach wurde den Tieren Blut entnommen und dann die gleiche Menge Relaxin erneut injiziert. 70 Tage später wiederholten wir die Blutentnahme und die Re-Injektion, diesmal mit 50 mg Relaxin bei Kaninchen A und B und 70 mg bei Kaninchen C. Kaninchen C starb kurz danach im anaphylaktischen Schock. 50 Tage danach wurde den Kaninchen A und B erneut Blut entnommen und nochmals je 25 mg Relaxin, diesmal in physiologischer Kochsalzlösung, injiziert. Nach 4 weiteren Tagen wurde von diesen beiden Tieren nochmals Blut abgezogen.

2. Immunologische Serumteste. Alle so gewonnenen Seren wurden mit der von OUCHTERLONY (1958) angegebenen Technik auf Doppeldiffusions-Agarplatten und nach der

Hämagglutinationsmethode von BOYDEN (1951) und STAVITZKY (1954) auf ihren Gehalt an Antikörpern untersucht. Die Ouchterlony-Platten der nach Abschluß der Immunisierung gewonnenen Antiseren aller drei Kaninchen zeigten deutliche Präcipitationsstreifen zwischen Relaxin und dem getesteten Serum in allen Verdünnungsstufen (von 1:1 bis 1:16; s. Abb. 1) als Beweis für einen Antikörpertiter dieser Seren gegen Relaxin. Die Höhe dieser Titer ergab sich aus dem Hämagglutinationstest: sie lag bei allen drei Kaninchen über 1:5 Millionen. Eine physikochemische oder immunoelektrophoretische Klärung des heterogenen Charakters der Kaninchen- γ -Globulin-Antikörper wurde nicht versucht.

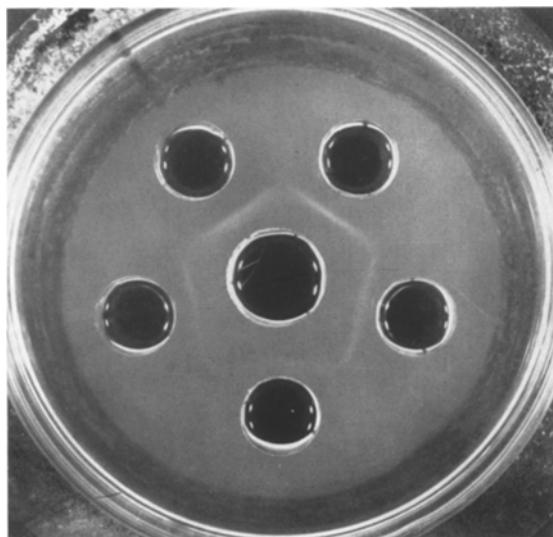


Abb. 1. Doppeldiffusionsagarplatte nach OUCHTERLONY. In zentraler Stanzhöhle Relaxinlösung, in peripheren Kaninchen-antisera in verschiedenen Verdünnungen: oben links 1:1, von dort im Uhrzeigersinn weiter 1:2, 1:4, 1:8 und 1:16. Entsprechen dem Grad der Verdünnung abnehmende Intensität des Präcipitationsstreifens zwischen Relaxin und Serum

isothiocyanat, andererseits mit Rhodamin-„B“-isothiocyanat gebunden. Diese Seren wurden dann zentrifugiert (3000 U/min) und zweimal durch eine chromatographische Säule (40 × 2 cm) geleitet, die mit Sephadex G 25 von mittlerer Körnchengröße gefüllt war (Technik nach PORATH et al. 1959 und KILLANDER et al. 1961). Die dadurch etwa sechsfach verdünnten Seren wurden in von Carbowax 4000 umgebenen Dialysebeuteln wieder auf Volumina von jeweils 6–10 ml konzentriert (nach LIPP 1961). Außerdem markierten wir Gesamtseren, extrahierte dann die γ -Globulinfraktion (nach CURTAIN 1961) und konzentrierten danach wieder mit Carbowax. Alle bisherigen Schritte wurden im Kühlraum bei 2° C durchgeführt. Einige cm³ von jedem der anschließend zum Färben verwandten konzentrierten Seren wurde dann zweimal mit Mäuse- und Kaninchen-Leberpuder je 1 Std lang absorbiert (nach COONS und KAPLAN) und bei 18000 U/min und 2° C 15 min lang zentrifugiert. Wie GOLDSTEIN et al. (1961) zeigten, wird auch bei Anwendung konjugierter γ -Globuline eine unspezifische Fluoreszenz nicht ganz beseitigt, jedoch ist sie geringer als bei Benutzung der Gesamtseren zum Färben. Auf jeden Fall waren Gewebepuder zur Absorption erforderlich.

4. Verwandtes Gewebe und Anfertigung der Gewebschnitte. Wir untersuchten Gewebsstücke: 1. aus 5 reifen, durch Kaiserschnitt vor Einsetzen der Wehen gewonnenen und einer

3. Markierung und weitere Zubereitung der Antiseren. Je 10 ml der Gesamtseren wurden nach der von NAIRN (1962) modifizierten Technik von COONS und KAPLAN (1950) einerseits mit Fluorescein-

reifen, spontan geborenen menschlichen Placenta; 2. aus 5 jungen, durch Abrasio gewonnenen Deciduen von einem Schwangerschaftsalter zwischen 8 und 20 Wochen; 3. aus einem Corpusendometrium kurz vor der Ovulation. Zahlreiche kleine Gewebsstücke dieser Fälle wurden sofort nach der Entnahme, großenteils noch lebenswarm, in einem von Trockeneis umgebenen Petroleum-Äthergemisch bei -70°C tiefgefroren und bei -40°C bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt. $2-4\text{-}\mu$ dicke Gefrierschnitte wurden im Kryostaten mit einem mit Trockeneis behälter versehenen Messer bei -18 bis -20°C angefertigt (nach PEARSE 1961) und diese Schnitte bei 4°C bis zum Färben aufgehoben.

5. Färbung der Gewebschnitte. Die benutzte Technik entsprach im wesentlichen der von COONS und KAPLAN (1950) und von NAIRN (1962) beschriebenen. Insgesamt wurden rund 200 Schnitte angefertigt, 10 min lang teils in 95%igem Äthylalkohol bei 37°C , teils in frischem Aceton bei 22°C fixiert und dann dreimal in einem Phosphat-Kochsalzpuffer von pH 7,2 für 10 min gewaschen. Anschließend erfolgte die Färbung mit markiertem Antiserum für 1–6 Std. Sowohl die direkte als auch die indirekte Färbmethode fanden Anwendung, die indirekte Methode einerseits mit markiertem, andererseits mit unmarkiertem Ziegen- und Schaf- γ -Globulin gegen Kaninchen- γ -Globulin.

Die den mit Fluorescein und Rhodamin gefärbten entsprechenden Schnitte sowie teilweise die Fluoresceinschnitte selbst wurden zu Vergleichszwecken mit Phloxin-Tartrazin gefärbt bzw. umgefärbt.

6. Kontrollen. Folgende Kontrollen dienten zur Sicherung der Spezifität der Reaktion:

a) Untersuchung fixierter, ungefärbter Schnitte zur Abgrenzung der spezifischen von der Eigenfluorescenz.

b) Färbung von Schnitten mit:

α) Fluorescein-markiertem normalem Kaninchenserum,

β) Fluorescein-markiertem Kaninchen- γ -Globulin gegen menschliches Fibrin,

γ) Fluorescein-markiertem Pferdeserum gegen Tetanustoxin als einem gegenüber dem hier untersuchten vollkommen fremden Antiserum zur Abgrenzung der spezifischen von unspezifischer Fluorescenz.

c) Blockierung der spezifischen Färbung durch vorherige Behandlung der Schnitte für 1–3 Std mit unmarkiertem Antiserum gegen Relaxin.

d) Entfernung der spezifischen Färbbarkeit mit den Antiseren durch zweimalige Absorption dieser Seren mit Relaxin für jeweils 1 Std und nachfolgende Absonderung des Präcipitats durch Zentrifugieren.

e) Vorbehandlung der Schnitte mit unmarkiertem normalem Kaninchenserum und nachfolgende Färbung mit markiertem Antiserum als positive Kontrolle. Gleichzeitig waren bei dieser Kontrolle durch Bindung eines Teils der unspezifischen Fluorescenz besonders klare Bilder zu erwarten (NAIRN 1962).

f) Färbung der Schnitte mit Rhodamin-markiertem Antiserum zum Vergleich mit den mit Fluorescein-markiertem Antiserum gefärbten Präparaten.

g) Die mit markiertem Antiserum gefärbten Schnitte der durch Spontangeburt gewonnenen Placenta dienten als Kontrolle, da nach der Wehentätigkeit kaum noch Relaxin im Placentargewebe zu erwarten ist (ZARBOW et al. 1955).

7. Mikroskop. Die Untersuchung erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop von Zeiss mit nicht fluoreszierenden planapochromatischen Objektiven, Dunkelfeld-Kardioid-Kondensor, Quecksilberhochdrucklampe HBO 200, Ultraviolett-Blaulicht-Filter (BG 12, 3 mm dick) und Sperrfilter OG 1, Gelb- oder Wratten Nr. 15-Ocularfilter.

Befunde

1. Placenta. In den nach der Direkt- und nach der Indirektmethode mit Fluorescein gefärbten Schnitten der Kaiserschnittplacenten hebt sich schon bei schwacher Vergrößerung die Basalplatte durch das hellere Leuchten eines Teiles ihrer Zellen vom übrigen Gewebe ab. Bei stärkerer Vergrößerung lassen sich diese Zellen ihrer Lage, Form und Struktur nach eindeutig als Trophoblastzellen erkennen und von den Deciduazellen abgrenzen. Ihr ganzes Cytoplasma fluorescirt

gleichmäßig hellgrün und in einigen Zellen stärker als in anderen (Abb. 2). Daneben erkennt man andere Trophoblastzellen ohne nennenswerte Fluorescenz des Cytoplasmas. Mehr oder weniger zahlreiche der hellgrünlich leuchtenden Trophoblastzellen enthalten scharf begrenzte, runde Einschlüsse, die sich durch ihre viel kräftigere grünliche Fluorescenz deutlich vom umgebenden Cytoplasma abheben (Abb. 2, 3 a). Eine Zelle beherbergt entweder mehrere kleine oder ein bis zwei größere Einschlüsse, die die Größe eines roten Blutkörperchens erreichen können. Auch die größten dieser Kugeln fluorescieren in allen Abschnitten homogen und lassen keine weiteren Strukturen in sich erkennen. Die

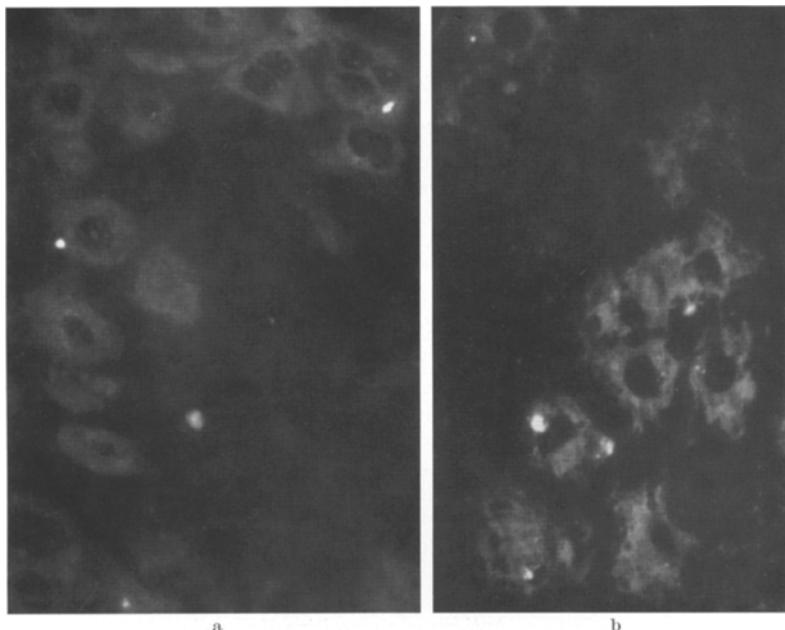


Abb. 2 a u. b. Durch Kaiserschnitt gewonnene reife Placenta. Gruppen von Trophoblastzellen der Basalplatte mit einzelnen oder mehreren stark fluorescierenden Körnern im Cytoplasma, das selbst mäßig mitleuchtet. Direktmethode. Färbung in a mit Fluorescein, in b mit Rhodamin. Vergr. 420 ×

kleineren liegen vorwiegend perinuklear oder auch an einer Seite des Kerns, die größeren meist im peripheren Cytoplasmabereich. Kleine derartige Einschlüsse finden sich zuweilen auch in Trophoblastzellen, deren Cytoplasma nicht im ganzen leuchtet, sondern nur in unmittelbarer Umgebung der Kugeln, die dadurch wie von einem leuchtenden Hof umgeben erscheinen. Die in der Direkt- und Indirektmethode mit Rhodamin markierten Präparate zeigen genau das gleiche Ergebnis mit dem einzigen Unterschied, daß das Cytoplasma hier gelblich und die Einschlüsse selbst rötlichgelb fluorescieren. Zwischen den unfixierten, in Alkohol oder in Aceton fixierten Präparaten besteht kein Unterschied in Farbe oder Intensität der Fluorescenz. Die 1 Std nach der Direktmethode bzw. 15 min nach der Indirektmethode (nach dreistündlicher Vorbehandlung mit unmarkiertem Serum) gefärbten Schnitte zeigen bereits eine sehr starke Fluorescenz; bei längeren Färbungszeiten wird nur der Untergrund im ganzen heller, die in Rede stehenden Einschlüsse bleiben unverändert. Die Indirektmethode läßt sie jedoch noch stärker aufleuchten als die Direktmethode.

Außer dieser findet sich in der Basalplatte mit Fluorescein keine weitere hellgrüne Fluorescenz irgendwelcher Gewebsstrukturen oder Zellen. Man erkennt lediglich eine goldgelbe Fluorescenz feinster, in Gruppen angeordneter Körnchen im Cytoplasma derjenigen Trophoblastzellen, die keine grünlich fluorescierenden Körner enthalten, und ferner im Cytoplasma feiner spindeliger, zwischen den Deciduazellen liegender Elemente. Diese goldgelbe Fluorescenz ist in allen untersuchten Präparaten, auch in den ungefärbten Kontrollschnitten vorhanden, so daß es sich hier um eine Eigenfluorescenz handelt (HAMPERL 1934). Im übrigen Placentargewebe fallen nur noch dünnspindelige Zellen auf, die als Gefäßwand-

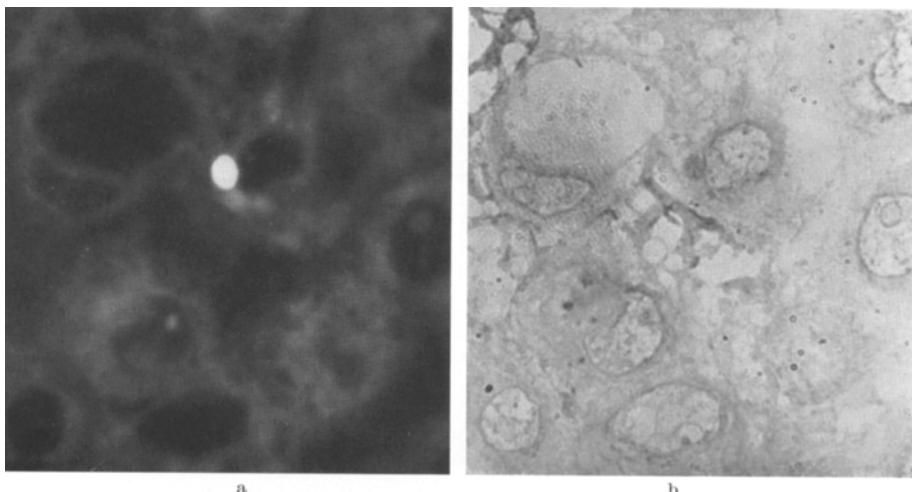


Abb. 3 a u. b. Durch Kaiserschnitt gewonnene reife Placenta. a Färbung mit Fluorescein-markiertem Antiserum nach Vorbehandlung mit Normalserum (positive Kontrolle): ein großer, stark fluorescierender Einschluß im Cytoplasma einer Trophoblastzelle der Basalplatte. b Umfärbung mit Phloxin-Tartrazin: der gleiche Einschluß hier dunkel (im Präparat rot). Vergr. 1055 × (auf $\frac{1}{10}$ verkleinert)

zellen konzentrisch um größere Gefäßlumina in den Placentarsepten angeordnet sind, und deren Cytoplasma in den nach der Direktmethode gefärbten Präparaten ebenfalls hellgrünlich fluoresciert. Die Kontrollschnitte zeigen aber, daß diese Fluorescenz unspezifisch ist, d.h. auch bei Färbung mit markiertem normalen Kaninchenserum auftritt. Andererseits ist sie nach Färbung mit Rhodamin und auch mit der Indirektmethode nicht nachweisbar. Die Zotten zeigen in unseren Präparaten außer einer geringfügigen Eigenfluorescenz kleiner Körnchen im Syncytium und in ganz vereinzelten Hofbauerzellen, wie sie schon von DEMPSEY und WISLOCKI (1944) und von ROCKENSCHAUB (1952) gesehen wurden, keine weitere Fluorescenz.

Kontrollen. Die beschriebenen leuchtend grün fluorescierenden Einschlüsse in einem Teil der Trophoblastzellen sind in allen durchgeführten Kontrollfärbungen negativ. Sie zeigen in den ungefärbten Präparaten keine Eigenfluorescenz. In den mit Pferdeserum, normalem Kaninchenserum und Antifibrin behandelten Schnitten heben sie sich ganz schwach dunkelgrün-gelblich von dem sie umgebenden dunklen Cytoplasma ab, zeigen aber keine Fluorescenz, ebensowenig wie das Cytoplasma der Trophoblastzellen selbst. Durch Absorption des markierten Antiseraums mit Relaxin wird die Färbefähigkeit von Cytoplasma und Ein-

schlüssen ebenso verhindert wie durch Vorbehandlung der Schnitte mit unmarkiertem Antiserum in der Direktmethode und mit unmarkiertem Anti-Antiserum in der Indirektmethode. Durch Vorbehandlung mit unmarkiertem normalem Kaninchenserum hingegen erscheint die Fluorescenz der Trophoblastzelleinschlüsse besonders klar und leuchtend (positive Kontrolle, s. Abb. 3a). Die basalen Trophoblastzellen der durch Spontangeburt gewonnenen Placenta enthalten keine fluorescierenden Einschlüsse, weder in der Direkt- noch in der Indirektmethode.

Die hier beschriebenen fluorescierenden Trophoblastzelleinschlüsse entsprechen in den mit Phloxin-Tartrazin gefärbten Vergleichsschnitten in Größe,

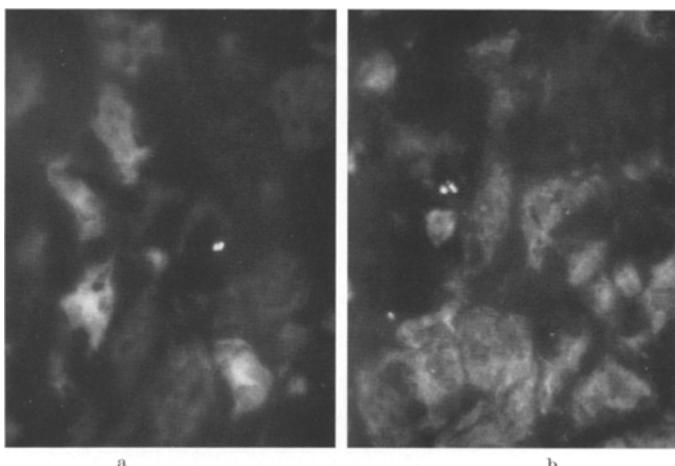


Abb. 4 a u. b. 16 Wochen alte Decidua. Jeweils in der Mitte eine Körnchenzelle mit stark fluorescierenden Körnchen. In der Umgebung mäßig helle (noch erhaltene) und stärker leuchtende (nekrotische) Deciduazellen (unspezifische Fluorescenz). Direktmethode. Färbung mit Rhodamin. Vergr. 405 ×

Form und Lagerung vollkommen den *Proteineinschlüssen* (DALLENBACH-HELLWEG und NETTE 1963). Den eindeutigen Beweis ihrer Identität erbringen die mit Phloxin-Tartrazin umgefärbten Fluorescenzschnitte, in denen sich die Einschlüsse leuchtend rot darstellen (Abb. 3 b). Es fällt lediglich auf, daß diese Einschlüsse in den Paraffinschnitten doppelt so häufig sind wie in den Kryostat-schnitten, was sich durch die unterschiedliche Schnittdicke bei beiden Verfahren ohne weiteres erklärt.

2. Decidua. In den mit Fluorescein gefärbten Präparaten (Direkt- und Indirektmethode) erkennt man zwischen den und am Rande der großen, nicht leuchtenden Deciduazellen kreisrunde, mehr oder weniger stark grünlich fluorescierende Körnchen, die im Cytoplasma kleiner rundlicher Zellen liegen (Abb. 4). Das Cytoplasma selbst leuchtet teils schwach, teils gar nicht; ein Teil der Körnchen ist von einem fluorescierenden Hof umgeben. In der Indirektmethode ist die Fluorescenz dieser Körnchen oft klarer abgesetzt als in der Direktmethode (Abb. 5). Die gleichen Körnchen zeigen nach Anfärbung mit Rhodamin eine rötlichgelbe Fluorescenz. Durch die beiden benutzten Fixierungen werden sie in ihrer Leuchtkraft nicht unterschiedlich beeinflußt. Außer diesen fluorescieren noch eine Reihe anderer Strukturen in denjenigen Deciduaabschnitten, die bereits beginnende oder fortgeschrittene Nekrose zeigen: Sowohl die

degenerierenden Deciduazellen als auch die Leukocyten weisen eine unspezifische hellgrüne Fluorescenz ihres Cytoplasmas auf, die in solchen Bezirken die Erkennung der in Rede stehenden Körnchen sehr erschweren kann. In den gut erhaltenen Abschnitten der Decidua dagegen sind diese Körnchen die einzigen fluoreszierenden Strukturen.

Kontrollen. Eine konstante Eigenfluorescenz konnten wir in unseren Deciduapräparaten nicht nachweisen. Auch alle übrigen, bereits bei der Placenta angeführten Kontrollfärbungen erweisen sich als negativ, d.h. die hier beschriebenen Körnchen zeigen in diesen Präparaten keine Fluorescenz, während nekrotische Deciduazellen und Leukocyten in allen mit Fluorescein oder Rhodamin gefärbten

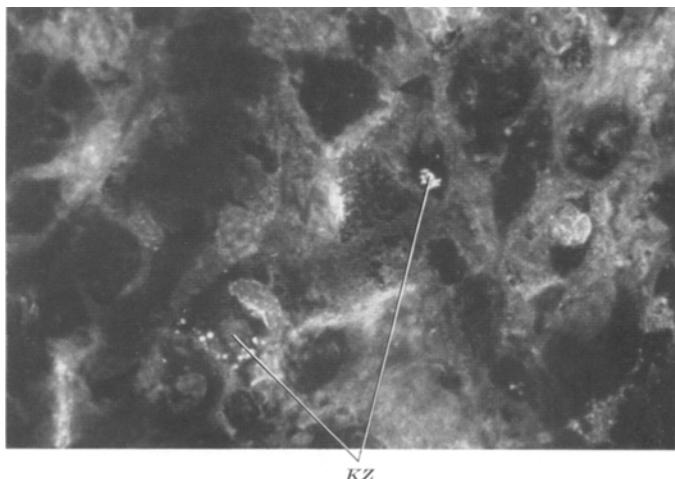


Abb. 5. Gleicher Fall wie Abb. 4. Zwei Körnchenzellen (KZ) mit deutlich fluoreszierenden Körnchen zwischen großen Deciduazellen. Indirektmethode. Färbung mit Fluorescein. Vergr. 690 ×

Schnitten gleich stark leuchten. Die Körnchen heben sich in den Kontrollschnitten nur ganz vereinzelt schwachgrün vom noch dunkleren Untergrund ab.

In den mit Phloxin-Tartrazin gefärbten Vergleichsschnitten entsprechen die beschriebenen fluoreszierenden Körnchen in allen Einzelheiten den Körnchen der *endometrialen Körnchenzellen* (HAMPERL 1954). Die Körnchen sind im Paraffinschnitt, wieder bedingt durch die größere Schnittdicke, etwa doppelt so zahlreich wie im Fluorescenzschnitt. Die mit Phloxin-Tartrazin umgefärbten Fluorescenzschnitte lassen ebenfalls hier und dort typische Körnchenzellen in gleicher Lagerung wie im Fluorescenzbild erkennen, jedoch scheinen die Körnchen aus einigen Zellen, wohl durch das unterschiedliche Verfahren gegenüber dem Paraffinschnitt, herausgefallen zu sein.

3. Endometrium. Das von uns fluorescenzmikroskopisch untersuchte Endometrium befindet sich am Ende der Proliferationsphase kurz vor der Ovulation. Das Stroma ist in den Funktionalisanteilen großzellig. In den mit Fluoresceinmarkiertem Antiserum gefärbten Schnitten (Direkt- und Indirektmethode) finden sich in diesen großzelligen Stromabezirken ein oder mehrere fluoreszierende Körnchen in einigen kleinen Zellen mit runden Kernen (Abb. 6a). Diese Körnchen liegen dem Kern zuweilen dicht an. In den indirekt gefärbten Präparaten

erkennt man außerdem, daß andere solcher runder Kerne von einem schmalen fluoreszierenden Hof umgeben sind. Die Körnchen gleichen in Form, Größe und Lagerung und in ihrer Fluorescenz mit Fluorescein und Rhodamin den in der Decidua beschriebenen Körnchen. Sie sind im Endometrium nur weniger zahlreich. Vereinzelte solcher diese Körnchen enthaltenden Zellen erkennt man auch im Bereich des Drüsens- und Oberflächenepithels. Die übrigen Stromazellen und die Drüsenepithelien erscheinen dunkel. In den mit Fluorescein und Rhodamin gefärbten Präparaten fluorescieren außer diesen Körnchen nur noch hier

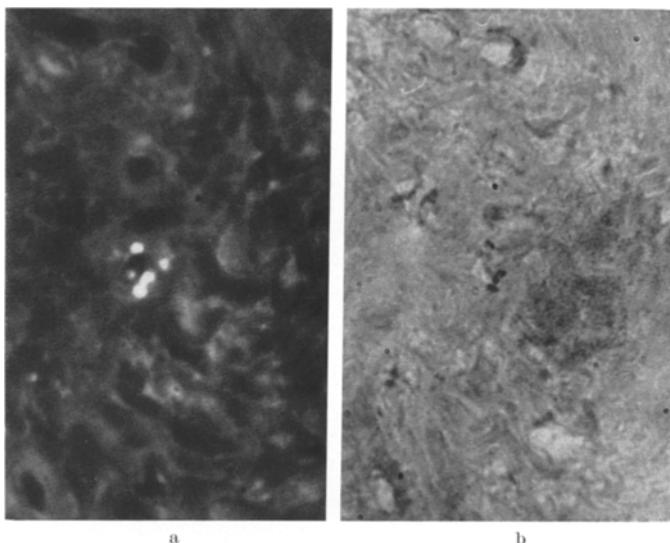


Abb. 6 a u. b. Corpusendometrium kurz vor der Ovulation. a Färbung mit Fluorescein (Direktmethode): in der Mitte Körnchenzelle mit stark fluorescierenden Körnchen. b Umfärbung mit Phloxin-Tartrazin: die gleichen Körnchen hier dunkel (im Präparat rot). Vergr. 1250 \times (auf $\frac{1}{10}$ verkleinert)

und dort als solche an ihrer typischen Granulierung deutlich erkennbare neutrophile und eosinophile Leukocyten, in den Rhodaminpräparaten außerdem die elastischen Fasern der Basalisarterien und das in einigen Drüsenumamina bereits enthaltene Sekret. Die Fluorescenz dieser Strukturen läßt sich in den Kontrollschnitten eindeutig als unspezifische erkennen, während die hier beschriebenen Körnchen sich in allen *Kontrollen* negativ verhalten, d. h. genau so wie die Körnchen in der Decidua. Die ungefärbten Kontrollschnitte lassen stellenweise reichlichere Ablagerungen von rotbraun bis goldgelb eigenfluorescierenden Körnchen erkennen, bei denen es sich höchstwahrscheinlich um Blutpigment handelt. Außer dieser weisen diese Präparate keine weitere Eigenfluorescenz auf.

Die mit Phloxin-Tartrazin umgefärbten Fluorescenzschnitte zeigen, daß die Zellen mit fluorescierenden Körnchen genau den *endometrialen Körnchenzellen* entsprechen (s. Abb. 6 b). Die Zellen, deren Kerne im Fluorescenzbild von einem schmalen leuchtenden Hof umgeben werden, zeigen im Tartrazin-Paraffinschnitt die typische Struktur der gerade in Differenzierung begriffenen Körnchenzellen: dichter, abgerundeter Kern mit schmalem, bräunlichem Cytoplasmasmaum, in dem man lichtoptisch nur mit Ölimmersion perinuklear bereits ein oder zwei feinste Körnchen erkennt.

Besprechung

Die in den Kryostatschnitten von Placenta, Decidua und Endometrium nach Behandlung mit der Coons-Methode beschriebenen intracytoplasmatischen fluoreszierenden Körner entsprechen in Lage, Größe, Form und Häufigkeit ganz genau den Proteineinschlüssen in den basalen Trophoblastzellen der Placenta und den Körnchen der endometrialen Körnchenzellen in Endometrium und Decidua, so daß wir ihre Identität mit den fluoreszierenden Körnern als bewiesen ansehen können. Das Ergebnis der Titerbestimmungen und der Ouchterlony-Platten berechtigt uns zu der Annahme, daß das zur direkten und indirekten Nachweismethode benutzte Serum Antikörper gegen Relaxin enthielt, und daß die Orte der Farbstoffbindung in unseren Präparaten mit großer Wahrscheinlichkeit der Lokalisation des Relaxins im Gewebe entsprechen. Dabei dürfte der Ort der Antigen-Antikörperreaktion direkt in den besonders kräftig fluoreszierenden Körnern zu suchen sein, während das teilweise Mitfluorescieren des Cytoplasmas als „Kranzeffekt“ aufzufassen ist.

Bei kritischer Bewertung aller zum Beweis der Spezifität der Reaktion durchgeführten Kontrollen kommt wohl als einzige Fehlerquelle die Möglichkeit in Betracht, daß das Relaxin mit unspezifischen Eiweißen verunreinigt gewesen sein könnte, gegen die sich unerwünschte Nebenantikörper gebildet hätten. Dagegen spricht aber 1. die Tatsache, daß wir nur nach neuesten Erkenntnissen chemisch weitgehend gereinigtes Relaxin verwandten, und 2. das Ergebnis unserer Ouchterlony-Platten, auf denen sich nur ein einfacher Präcipitationsstreifen zwischen Relaxin und den Kaninchen-Antiserenen bildete (s. Abb. 1).

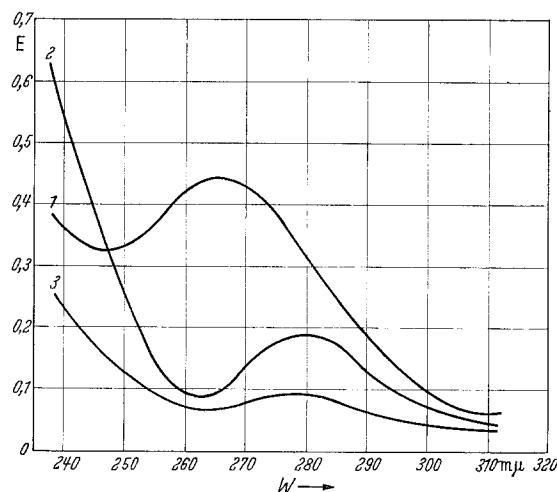


Abb. 7. Absorptionskurve eines Zellkerns einer Körnchenzelle (1), eines Körnchens einer Körnchenzelle (2) und des Cytoplasmas zwischen den Körnchen (3). Nach HELLWEG und SANDRITTER 1956

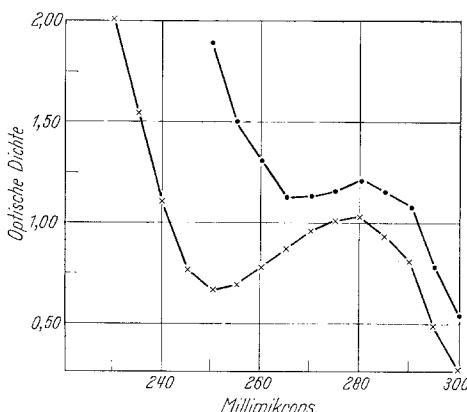


Abb. 8. Ultraviolettspektrophotometrische Absorptionskurve von weitgehend gereinigtem Relaxin (Fraktion C₁-Sephadex) in saurer (x) und alkalischer (•) Lösung. Nach COHEN 1963

Wie wir bereits früher zeigten, sind die Körnchen der endometrialen Körnchenzellen und die Proteineinschlüsse der basalen Trophoblastzellen auch histochemisch weitgehend identisch (HELLWEG 1956; DALLENBACH-HELLWEG und NETTE 1963), und zwar entspricht die chemische Zusammensetzung beider Körnerarten in wesentlichen Punkten der des Relaxins (COHEN 1963), so z.B. ihre Proteinnatur ohne nachweisbare prosthetische Gruppe und ihr Gehalt an Histidin, Arginin, Cystin, Tyrosin und Tryptophan. Die ausgesprochene Acidophilie der Körnchen paßt zu dem hohen Gehalt des Relaxins an basischen Aminosäuren. Darüber hinaus ist die ultraviolettmikrospektrographische Absorptionskurve der Körnchen der endometrialen Körnchenzellen (HELLWEG und SANDRITTER 1956, s. Abb. 7) so gut wie deckungsgleich mit der kürzlich von COHEN (1963) gefundenen Absorptionskurve des Relaxins (Abb. 8). Das zahlenmäßige Vorkommen der Proteineinschlüsse in der Placenta im Laufe der Gravidität entspricht genau der Menge des biochemisch im Placentargewebe nachgewiesenen Relaxins (ZARROW et al. 1955). Genaue biochemische Messungen über den Relaxingehalt des menschlichen Endometriums liegen noch nicht vor, jedoch wurde klinisch eine relaxierende Wirkung an Cervix (EICHNER et al. 1956) und Symphyse (GOLDTHWAIT und OSGOOD 1905; CHAMBERLAIN 1930) kurz vor und während der Menstruation beobachtet.

Es fragt sich nun, ob dieses Relaxin in den endometrialen Körnchenzellen und basalen Trophoblastzellen gebildet oder gespeichert wird. Die Struktur der Proteineinschlüsse enthaltenden Trophoblastzellen läßt eine Eiweißsynthese in ihnen sicher erscheinen, wobei auf Grund aller erhobenen Befunde in erster Linie an eine Hormonproduktion zu denken war (DALLENBACH-HELLWEG und NETTE 1963). Die Entstehung auch der Körnchen der endometrialen Körnchenzellen im Cytoplasma wurde an Hand früherer Untersuchungen von einem von uns (HELLWEG 1954) vermutet und ein Zusammenhang ihrer Funktion mit dem Wirkungsmechanismus des Progesteron bzw. überhaupt einer hormonellen Funktion angenommen (HELLWEG, FERIN, OBER 1960). Bei einer solchen intracellulären Bildung des Relaxins auch in den Körnchenzellen wäre seine Abgabe wahrscheinlich als holokrine Sekretion vorzustellen, wie sie auch gut in den Rahmen der Körnchenzellauflösung während der Menstruation passen würde. Andererseits erinnern die in einigen Körnchenzellen während der Menstruation gefundenen Vacuolen (s. HELLWEG 1957, S. 660, Abb. 2) sehr an die vacuolierten Trophoblastzellen in den spontan geborenen Placenten.

Wie lassen sich, abgesehen von der chemischen und morphologischen Ähnlichkeit, unsere Befunde über den Relaxinnachweis in endometrialen Körnchenzellen und placentaren Trophoblastzellen, d.h. in zwei verschieden gearteten und zu verschiedener Zeit auftretenden Zellen, funktionell auf einen gemeinsamen Nenner bringen? Über die *Funktion* des Relaxins ist klinisch und tierexperimentell viel gearbeitet worden; dennoch widersprechen sich ein Teil der Ergebnisse bis heute. Die meisten Autoren sind sich aber über drei wesentliche Wirkungen des Relaxins beim Menschen einig: 1. Eine Cervixerweiterung kurz vor und während der Geburt (EICHNER et al. 1956; ZARROW 1957; BIRNBERG und ABITBOL 1957 und 1959), die zur Geburtsverkürzung führt (STONE et al. 1959; STONE 1959). 2. Eine Wehenhemmung bzw. -verlangsamung, die solange anhält, bis die Geburtswege regelrecht erweitert sind (ABRAMSON und REID 1955; FOLSOME et al. 1956; EICHNER

et al. 1956 und 1959; ABRAMSON 1957; McCARTHY et al. 1957; ENGSTRÖM und WIQUIST 1959; REZEK 1959). Haben dagegen nach regelrechter Eröffnung die eigentlichen Geburtswehen begonnen, so hat Relaxin keinen Einfluß mehr auf diese Wehentätigkeit (SLATE und MENGERT 1960; WARE und HAYNES 1962). 3. Eine Auflösung des Bindegewebes mit Depolymerisation der Grundsubstanz. Diese wurde beim Menschen bisher nur von SANDS und STONE (1958) näher untersucht. An der Meerschweinchensymphysis wurde eine Auflösung der kollagenen Fasern von TALMAGE (1947), HERINGA und VAN DER MEER (1948) und PERL und CATCHPOLE (1949) nachgewiesen. Wie schon erwähnt, fanden EICHNER et al. (1956) an der Cervix und GOLDTHWAIT und OSGOOD (1905) sowie CHAMBERLAIN (1930) an der Symphyse klinisch eine relaxierende Wirkung auch kurz vor und während der Menstruation. STAEMMLER (1953), DUBRAUSZKY und SCHMITT (1958) und CRAIG (1963) wiesen im Endometrium histologisch prämenstruell eine Auflösung von Reticulumfasern nach, ohne deren Ursache zu kennen. Für die prämenstruelle Auflösung der Reticulumfasern des *Endometriums* und für die zur gleichen Zeit zu beobachtende relaxierende, d.h. histologisch ebenfalls faserauflösende Wirkung an Cervix und Symphyse könnten nun sehr wohl die Körnchenzellen mit ihrem Relaxingehalt verantwortlich sein. Sie erreichen im Endometrium während des Cyclus gerade kurz vor der Menstruation ihre größte Zahl (HELLWEG 1954). Sie würden durch diese beiden Wirkungen, Auflösung und Ablösung der abzustoßenden Schleimhaut und Erweiterung des Cervicalkanals, zur *Erleichterung der Menstruation* beitragen.

Tritt keine Menstruation ein, so könnte man ihr weiteres zahlenmäßiges Ansteigen in der jungen *Decidua* so erklären, daß die faserauflösende Relaxinwirkung nun die *Implantation* des Eies ermöglicht, indem es den Trophoblastzellen das Eindringen in die *Decidua* und deren Auflösung am Implantationsort erleichtert. Eine Auflösung der Retikulumfasern in Umgebung der Implantationsstelle des menschlichen Eies haben BREWER (1938), KRAFKA (1941) und WISLOCKI und DEMPSEY (1948) beschrieben. In der Tat häufen sich die Körnchenzellen, die ja wandernde Zellen sind (HELLWEG und SHAKA 1959), gerade im Bereich der chorialen Invasion besonders zahlreich an (HELLWEG 1957). Im Tierexperiment erzielte FAINSTAD (1963) eine dem Befund in der Schwangerschaft vergleichbare ödematöse Auflockerung und beginnende Auflösung des Bindegewebes in der antimesometrialen Zone des Uterus bei der nicht schwangeren Ratte nach Injektion von Relaxin. Diese Zone entspricht dem Bereich, in dem nach Befruchtung die Implantation erfolgt.

Bei der Ablösung und Ausstoßung der *Placenta* könnte den Proteineinschlüssen in den basalen Trophoblastzellen sehr wohl eine analoge Wirkung zukommen: eine lokale Faserauflösung im Bereich der Basalplatte und eine zur gleichen Zeit erfolgende Erweiterung der Geburtswege. Tatsächlich liegen die Proteineinschlüsse genau an der Stelle, an der die Placenta sich von der Uteruswand lösen muß. Morphologisch läßt sich in diesem Bereich eine derartige Faserauflösung einwandfrei nachweisen (HERTIG). Die als Fernwirkung des Hormons aufzufassende Erweiterung der Geburtswege ist ebenfalls das Ergebnis einer Faserauflösung. Die relaxinhaltigen Proteineinschlüsse würden also hier mit ihren beiden Hand in Hand gehenden Wirkungen, der Ablösung der Placenta und der Erweiterung der Geburtswege, zur *Erleichterung der Geburt* beitragen. Interessanterweise

hemmt Relaxin die Wehentätigkeit, solange diese Erweiterung und Lockerung noch nicht vollständig ist. Erst nach Wegfall des Relaxineinflusses kann sich die wehenerregende Oxytocinwirkung entfalten. Diese klinische Beobachtung deckt sich sehr gut mit unseren morphologischen Befunden, daß die Protein-einschlüsse nur in den Placenten nachweisbar waren, die vor Einsetzen der Wehen gewonnen wurden, nicht aber in den nach kürzerer oder längerer Wehentätigkeit spontan geborenen.

In das hier entworfene Schema lassen sich mühelos alle bisher klinisch beobachteten Relaxinwirkungen einordnen. Die scheinbar paradoxe Gleichzeitigkeit von Wehenhemmung und Geburtsverkürzung wird dadurch ohne weiteres verständlich, ebenso die sehr unterschiedlichen Angaben über die Wirkung von Relaxin bei der Geburtseinleitung (STONE et al. 1958), da Relaxin sozusagen die Einleitung der Geburtswehen erst freigibt, wenn die Geburtswege regelrecht erweitert sind. Es kann daher nicht verwundern, daß einige Autoren keine konstante Wirkung des Relaxins auf die Wehentätigkeit sahen (KELLY 1959; DECKER 1959; SLATE und MENGERT 1960; WARE und HAYNES 1962). Auch die wehenverkürzende Wirkung des Relaxins (BIRNBERG und ABITBOL 1957) ist gut zu verstehen, denn je besser die Erweiterung des Geburtskanals, um so weniger werden die Wehen noch zu leisten haben. So fand EISENBERG (1957) bei der Geburt die therapeutisch erforderliche Oxytocinmenge vermindert, wenn vorher Relaxin verabreicht wurde.

Da sozusagen der Vorgang der Geburt dem der Menstruation im Grundprinzip sehr nahe steht und nur im Ausmaß um ein Vielfaches gesteigert ist, erscheint es logisch, daß beide Vorgänge durch das gleiche Hormon gefördert werden. Die als morphologisches Substrat dieses Hormons anzusehenden Körnchen der endometrialen Körnchenzellen und der basalen Trophoblastzellen sehen sich histologisch zum Verwechseln ähnlich, nur die sie beherbergenden Zellen sind verschieden. Die Kleinheit der Körnchenzellen ist vielleicht daraus zu verstehen, daß sie zum Implantationsort wandern und daher sehr beweglich sein müssen. Wir möchten unseren Befunden eine weitere Bestätigung dafür entnehmen, daß das gleiche Hormon in ganz verschiedenen Zellen des Organismus gebildet bzw. gespeichert werden kann.

Fragen wir uns abschließend, welche Auswirkung eine Unterfunktion der Körnchenzellen auf die Menstruation haben könnte, so würde man an eine Erschwerung mit Fehlen der Schleimhautauflösung und der Cervixerweiterung denken — eine Kombination, wie wir sie unter dem Bild der bis heute ätiologisch noch unklaren Dysmenorrhoea membranacea kennen. Genauere Untersuchungen der Körnchenzellen bei dieser und anderen funktionellen Störungen des Endometriums, wie z. B. auch der verzögerten Abstoßung sowie verschiedener Formen der Dysmenorrhoe könnte vielleicht zur Klärung mancher noch schwer verständlicher klinischer Bilder führen. Tatsächlich wurde Relaxin von einigen Autoren schon zur Behandlung der Dysmenorrhoe, zum Teil mit gutem Erfolg, angewandt (REZEK 1953; JONES und SMITH 1954; KUPPERMAN et al. 1959). Es wäre z. B. denkbar, daß diejenigen Fälle von Dysmenorrhoe, bei denen sich eine Verminderung der Körnchenzellen im prämenstruellen Endometrium nachweisen ließe, besonders gut mit Relaxin zu beeinflussen wären.

Zusammenfassung

Mit Hilfe der direkten und indirekten Immunofluoreszenzmethode nach COONS gelang der Nachweis von Relaxin in menschlicher Placenta, Decidua und Endometrium. Dem Ort der Antigen-Antikörperreaktion entsprachen in der Placenta die Proteineinschlüsse der basalen Trophoblastzellen (DALLENBACH-HELLWEG und NETTE) und in Decidua und Endometrium die Körnchen der endometrialen Körnchenzellen (HAMPERL). Auf Grund aller früher erhobenen Befunde erscheint es sehr naheliegend, daß das Relaxin in diesen zwei Zellarten nicht nur gespeichert, sondern auch gebildet wird. Die aus dem zeitlichen und örtlichen Vorkommen dieser Zellen und aus den bisherigen klinischen Untersuchungen abzuleitende Funktion des Relaxins scheint danach im wesentlichen eine Auflösung der Bindegewebsfasern zu sein, die sich als Lokal- und als Fernwirkung entfaltet. Ihr Substrat ist 1. die Auf- und Ablösung der Menstruationsschleimhaut (lokal) und die Cervixerweiterung (distal) zur Erleichterung der Menstruation; 2. die Faserauflösung in der jungen Decidua im Bereich der chorialen Invasion zur Erleichterung der Implantation; 3. die Ablösung der Placenta (lokal) und Erweiterung der Geburtswege (distal) zur Erleichterung der Geburt. Die sich im Grundprinzip nahestehenden Vorgänge der Menstruation und der Geburt werden demnach durch das gleiche Hormon Relaxin gefördert, dessen morphologisches Substrat in histologisch, histochemisch und fluoreszenzmikroskopisch übereinstimmenden Körnchen zweier verschiedener Zellarten zu suchen ist.

Immunohistological Studies of the Localization of Relaxin in Human Placenta and Decidua

Summary

With the direct and indirect immunofluorescence method of COONS it is possible to demonstrate relaxin in the human placenta, decidua and endometrium. In the placenta the site of the antigen-antibody reaction corresponds to the *protein inclusions* of the basal trophoblastic cells (DALLENBACH-HELLWEG und NETTE). In the decidua and endometrium it corresponds to the granules of the endometrial granulocytes (HAMPERL). On the basis of results previously published it appears very probable that relaxin is not only stored in these two types of cells but is also formed there. As deduced from the temporal and spatial occurrence of these cells and from the clinical studies already made, the function of relaxin seems accordingly to be a dissolution of connective tissue fibers, an effect exerted either locally or in distant parts. The morphological representations of this effect are: 1. The dissolution and shedding of the menstrual mucosa (local effect) and the dilatation of the cervix (distant effect) facilitating menstrual flow. 2. The dissolution of fibers in the young decidua in the region of the chorial invasion facilitating implantation. 3. The separation of the placenta (local effect) and dilatation of the birth canal (distant effect) to promote delivery. The processes of menstruation and childbirth, basically very closely related, are advanced by the same hormone — relaxin —, whose morphological representation may be seen histologically, histochemically and fluorescent microscopically in analogous granules of two different cell types.

Literatur

- ABRAMSON, D.: Management of premature labor. *Transact. New Engl. Obstet. Gynec. Soc.* **11**, 13 (1957).
- E. HURWITT and G. LESNICK: Relaxin in human serum as a test for pregnancy. *Surg. Gynec. Obstet.* **65**, 335 (1937).
- , and D. E. REID: Use of relaxin in treatment of threatened premature labor. *J. clin. Endocr.* **15**, 206 (1955).
- ALBERT, A., W. L. MONEY and M. X. ZARROW: An improved method of extraction and purification of relaxin from fresh whole ovaries of the sow. *Endocrinology* **40**, 370 (1947).
- BIRNBERG, C. H., and M. M. ABITBOL: Refined relaxin and length of labor. *Obstet. and Gynec.* **10**, 366 (1957).
- — The use of cervilaxin in term labor. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **75**, 1016 (1959).
- BOYDEN, S. V.: The adsorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein sera. *J. exp. Med.* **93**, 107 (1951).
- BREWER, J. I.: A human embryo in the bilaminar blastodisc stage. *Contrib. Embryol. Carneg. Inst.* **37**, 85 (1938).
- CASSANO, F., R. CHISCI e C. TARANTINO: Sulla presenza di relaxina nella decidua placentare di pecora; nota preventiva. *Folia endocr. (Roma)* **5**, 63 (1952).
- CHAMBERLAIN, W. E.: The symphysis pubis in the roentgen examination of the sacroiliac joint. *Amer. J. Roentgenol.* **24**, 621 (1930).
- COHEN, H.: Relaxin: Studies dealing with isolation, purification, and characterization. *Trans. N.Y. Acad. Sci.* **25**, 313 (1963).
- COONS, A. H., and M. H. KAPLAN: Localization of antigen in tissue cells. II. Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. *J. exp. Med.* **91**, 1 (1950).
- CRAIG, J. M.: Reticulum and collagen in the human endometrium. *Amer. J. Obstet. Gynec.* **86**, 421 (1963).
- CURTAIN, C. C.: The chromatographic purification of fluorescein antibody. *J. Histochem. Cytochem.* **9**, 484 (1961).
- DALLENBACH-HELLWEG, G., u. G. NETTE: Über Proteineinschlüsse in basalen Trophoblastzellen der reifen menschlichen Placenta. *Virchows Arch. path. Anat.* **336**, 528 (1963).
- DECKER, W. H.: Some clinical observations of relaxin in obstetrics. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **75**, 991 (1959).
- DEMPSEY, E. W., and G. B. WISLOCKI: Observations on some histochemical reactions in the human placenta with special reference to the significance of the lipoids, glycogen and iron. *Endocrinology* **35**, 409 (1944).
- DUBRAUSZKY, V., u. H. SCHMITT: Mikroskopische und elektronenmikroskopische Untersuchungen am Gitterfaser system der Corpusmucosa während des Zyklus und der Gestation. *Arch. Gynäk.* **191**, 212 (1958).
- EICHNER, E., I. HERMAN, L. KRITZER, G. M. PLATOCK and L. RUBINSTEIN: The effects of relaxin on term and premature labor. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **75**, 1023 (1959).
- C. WALTNER, M. GOODMAN and S. POST: Relaxin, the third ovarian hormone; its experimental use in women. *Amer. J. Obstet. Gynec.* **71**, 1035 (1956).
- EISENBERG, L.: Facilitation of full-term Labor with relaxin. *J. Amer. osteopath. Ass.* **57**, 146 (1957).
- ENGSTRÖM, L., and N. WRQUIST: The effect of relaxin on the duration of labour induced by oxytocin. *Acta obstet. gynec. scand.* **38**, 172 (1959).
- FAINSTAD, T.: Extracellular studies of uterus. I. Disappearance of the discrete collagen bundles in endometrial stroma during various reproductive states in the rat. *Amer. J. Anatomy* **112**, 337 (1963).
- FOLSOME, C. E., T. HARAMI, S. R. LAVIETES and G. M. MASSELL: Clinical evaluation of relaxin. *Obstet. and Gynec.* **8**, 536 (1956).
- FRIEDEN, E. H.: Purification and electrophoretic properties of relaxin preparations. *Trans. N.Y. Acad. Sci.* **25**, 331 (1963).
- GOLDSTEIN, G., I. S. SLIZYS and M. W. CHASE: Studies on fluorescent antibody staining. I. Non-specific fluorescence with fluorescein-coupled sheep anti-rabbit globulins. *J. exp. Med.* **114**, 89 (1961).

- GOLDTHWAIT, J. E., and R. B. OSGOOD: A consideration of the pelvic articulations from an anatomical, pathological, and clinical standpoint. *Boston med. surg. J.* **152**, 593 (1905).
- HAMPERL, H.: Die Fluoreszenzmikroskopie menschlicher Gewebe. *Virchows Arch. path. Anat.* **292**, 1 (1934).
- Über endometriale Granulocyten (endometriale Körnchenzellen). *Klin. Wschr.* **32**, 665 (1954).
- HELLWEG, G.: Über endometriale Körnchenzellen (endometriale Granulocyten). *Arch. Gynäk.* **185**, 150 (1954).
- Untersuchungen zur Characterisierung der Granula in endometrialen Körnchenzellen. *Virchows Arch. path. Anat.* **329**, 111 (1956).
- Über Auftreten und Verhalten der endometrialen Körnchenzellen im Verlauf der Schwangerschaft, im krankhaft veränderten Endometrium und außerhalb des Corpus uteri. *Virchows Arch. path. Anat.* **330**, 658 (1957).
- J. FERIN u. K. G. OBER: Über die Bildung von endometrialen Körnchenzellen bei Kastratinnen unter Hormoneinfluß. *Acta endocr. (Kbh.)* **33**, 261 (1960).
- , u. W. SANDRITTER: Ultraviolettspektrophotometrische Untersuchungen an den Körnchen der endometrialen Körnchenzellen. *Klin. Wschr.* **34**, 1040 (1956).
- , and J. A. SHAKA: Endometrial granulocytes. Tissue culture studies of endometrium and decidua with special attention to the endometrial granulocytes. *Obstet. and Gynec.* **13**, 519 (1959).
- HERINGA, G. C., u. C. VAN DER MEER: zitiert nach HISAW (1950).
- HERTIG, A. T.: Persönliche Mitteilung.
- HISAW, F. L.: Experimental relaxation of the pubic ligament of the guinea pig. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **23**, 661 (1926).
- , and M. X. ZARROW: Relaxin in the ovary of the domestic sow. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **69**, 395 (1948).
- — The physiology of relaxin. *Vitam. and Horm.* **8**, 151 (1950).
- JONES, G. S., and F. SMITH: The treatment of the dysmenorrhea symptom complex: a preliminary report on the efficacy of a uterine "relaxing factor". *Amer. J. Obstet. Gynec.* **67**, 628 (1954).
- KELLY, J. V.: Effects of relaxin on the nonpregnant and pregnant uterus. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **75**, 998 (1959).
- KILLANDER, J., J. PONTÉN and L. RODÉN: Rapid preparation of fluorescent antibodies using gel filtration. *Nature (Lond.)* **192**, 182 (1961).
- KRAFKA, J.: The Torpin ovum, a presomite human embryo. *Contrib. Embryol. Carneg. Inst.* **29**, 169 (1941).
- KUPPERMAN, H. S., D. ROSENBERG and A. CUTLER: Relaxin in dysmenorrhea and its effect in vitro upon muscular contraction. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **75**, 1003 (1959).
- LIPP, W.: Use of gel filtration and polyethylene glycol in the preparation of fluorochrome-labelled proteins. *J. Histochem. Cytochem.* **9**, 458 (1961).
- MCCARTHY, J. J., H. W. ERVING and L. E. LAUFE: Preliminary report on the use of relaxin in the management of threatened premature labor. *Amer. J. Obstet. Gynec.* **74**, 134 (1957).
- NAIRN, R. C.: Fluorescent protein tracing, S. 19—21. Edinburgh & London: E. & S. Livingstone Ltd. 1962.
- OUCHTERLONY, O.: Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. *Progr. Allergy* **5**, 1 (1958).
- PEARSE, A. G. E.: Histochemistry — theoretical and applied, 2nd ed., p. 20. London: J. & A. Churchill Ltd. 1961.
- PERL, E., and H. R. CATCHPOLE: Effect of estrogen and relaxin on the connective tissue of the pubic symphysis. *Fed. Proc.* **8**, 126 (1949).
- POMMERENKE, W. T.: Experimental ligamentous relaxation in the guinea pig pelvis. *Amer. J. Obstet. Gynec.* **27**, 708 (1934).
- PORATH, J., and P. FLODIN: Gel filtration: A method for desalting and group separation. *Nature (Lond.)* **183**, 1657 (1959).
- REZEK, G. H.: The effect of a new potent uterine relaxing factor of the corpus luteum in the treatment of dysmenorrhea. *Amer. J. Obstet. Gynec.* **66**, 396 (1953).
- Lutrexin in the treatment of premature labor. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **75**, 995 (1959).

- ROCKENSCHAUB, A.: Eigenfluoreszenz und Hormonbildung in der Plazenta. *Mikroskopie* **7**, 56 (1952).
- SANDS, R. X., and M. L. STONE: Current status of relaxin. *West. J. Surg.* **66**, 115 (1958).
- SHER, I. H., and G. J. MARTIN: Relaxin. A review. *Exp. Med. Surg.* **14**, 89 (1956).
- SLATE, W. G., and W. F. MENGERT: Effect of the relaxing hormone on the laboring human uterus. *Obstet. and Gynec.* **15**, 409 (1960).
- STAEMMLER, M.: Untersuchung über die Bedeutung der Gitterfasern im Stroma der Uterusschleimhaut. *Arch. Gynäk.* **182**, 445 (1953).
- STAVITSKY, A. B.: Micromethods for the study of proteins and antibodies. I. and II. *J. Immunol.* **72**, 360, 368 (1954).
- STEINETZ, B. G.: Relaxin assay methods. *Trans. N.Y. Acad. Sci.* **25**, 307 (1963).
- V. L. BEACH and R. L. KROC: The physiology of relaxin in laboratory animals. *Rec. Progr. Endocrin. Reprod.* *Lloyd*, S. 389. New York: Acad. Press 1959.
- STONE, M. L.: Effects of relaxin in the human. *Rec. Progr. Endocrin. Reprod.* *Lloyd*, S. 429. New York: Acad. Press 1959.
- A. SEDLIS and M. B. ZUCKERMAN: Relaxin — a critical evaluation. *Amer. J. Obstet. Gynec.* **76**, 544 (1958).
- — — Effects of relaxin on term and premature labor. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **75**, 1011 (1959).
- TALMAGE, R. V.: A histological study of the effects of relaxin on the symphysis pubis of the guinea pig. *J. exp. Zool.* **106**, 281 (1947).
- WARE, D., and D. M. HAYNES: A study of relaxin in primigravidas. *Amer. J. Obstet. Gynec.* **83**, 792 (1962).
- WISLOCKI, G. B., and E. W. DEMPSEY: The chemical histology of human placenta and decidua with reference to mucoproteins, glycogen, lipids and acid phosphatase. *Amer. J. Anat.* **83**, 1 (1948).
- ZARROW, M. X.: Role of steroid hormones in relaxation of symphysis pubis of the guinea pig. *Endocrinology* **42**, 129 (1948).
- The antidiuretic action of relaxin-containing preparations. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **71**, 705 (1949).
- Maternal hormones in pregnancy. *Transact. 3rd Conf. on Gestation*, S. 17. Princeton, N. J.: Josiah Macy Jr. Foundation 1957.
- E. G. HOLMSTROM and H. A. SALHANICK: The concentration of relaxin in the blood serum of normal pregnant women. *Endocrinology* **15**, 22 (1955).

Professor Dr. F. D. DALLENBACH, Dartmouth Medical School,
Hanover, New Hampshire, USA