

SYMPOSIA BIOLOGICA HUNGARICA

Symposia Biologica Hungarica

PHYSIOLOGIE
(BEWEGUNG)
DER SPERMIEN

4



AKADÉMIAI KIADÓ, BUDAPEST

PHYSIOLOGIE (BEWEGUNG) DER SPERMIIEN

Symposion in Budapest, Oktober
1960

Herausgegeben von I. TÖRÖ

(Symposia Biologica Hungarica 4.)

Die biologischen und praktischen Fragen der Spermienbewegung wurden von deutschen, italienischen, polnischen, tschechoslowakischen und ungarischen Forschern erörtert. Die Vorträge befassen sich mit der Zusammensetzung der Spermien, mit ihrer Biochemie und Struktur sowie den Veränderungen, die in den Spermien infolge der hormonalen, neuralen und anderen Einflüsse entstehen. Fragen der Pathologie der Spermien, der Bedeutung der Spermienbewegung in der forensischen Praxis sowie in der praktischen Tierzucht wurden ebenfalls besprochen.



VERLAG DER UNGARISCHEN
AKADEMIE
DER WISSENSCHAFTEN
BUDAPEST V.
ALKOTMÁNY UTCA 21

Symposia
Biologica
Hungarica

4.

Symposia Biologica Hungarica

Redigit

I. TÖRŐ

Redigenda curavit

M. MÜLLER

Vol. 4.



AKADÉMIAI KIADÓ, BUDAPEST 1964

PHYSIOLOGIE
(BEWEGUNG)
DER SPERMIEN

Symposion in Budapest, Oktober 1960



AKADÉMIAI KIADÓ, BUDAPEST 1964



INHALT

Vorwort	7
Teilnehmerverzeichnis	9
HYNIE, J.: Veränderungen der Motilität der Spermien durch einige äußere und innere Einflüsse	11
GIAROLA, A.—BALLERIO, C.: Aspects particuliers de la cytodynamique némaspermiqne «in vitro»	17
MÉSZÁROS, I.: Die Spermaqualität beeinträchtigende exogene und endogene Faktoren	27
BUDVÁRI, R.: Belebungsversuche mit Kondomsperma	31
MILCOU, S. M.—MADELEINE MAICANESCO—HELÈNE DINULESCO: Importance clinique de l'étude morphologique du sperme en relation avec le métabolisme du fructose	35
MOLNÁR, J.: Der Fruktosegehalt im Spermaplasma von Nekrospermien	45
DOEPFMER, R.: Die klinische Bedeutung der Aminosäuren im menschlichen Ejakulat KRAMPITZ, G.: Über die chromatographische Bestimmung von Aminosäuren im menschlichen Sperma	51
SANDRITTER, W.—GROSSER, K. D.: Quantitative histochemische Untersuchungen an Spermien	63
BECZE, J.: Über die Zusammenhänge zwischen den Bewertungsfaktoren des Bullensamens und der Befruchtung	79
PÓSSALAKY, Z.: Histochemische Untersuchungen der Spermiogenese	83
RUČKI, T.: Bemerkungen über histochemische und hormonale Fragen der Spermiogenese	89
MOLNÁR, J.: Bewegungsverhältnisse der Spermien aus Spermatozelen	93
DOEPFMER, R.: Zur Frage der Mißerfolge bei homologen Samenübertragungen ..	99

VORWORT

Mit der Entwicklung der wissenschaftlichen Forschungsmethoden wird es immer leichter, jenen Ansprüchen zu genügen, nach welchen die wissenschaftliche Forschung gleichzeitig mit der Analyse grundlegender biologischer Fragen auch die Probleme der Praxis löst. Die Forschung der Biologie und Pathologie der männlichen Geschlechtszellen hat in der letzten Zeit einen großen Aufschwung genommen. An der Forschung nehmen Zytologen, Histologen, Embryologen, Chemiker, Genetiker, Urologen, Tierärzte usw. gleichermaßen teil, denn die biologischen Eigenschaften der männlichen Geschlechtszellen sind für die Fachmänner vieler Disziplinen von größtem Interesse. Es zeigte sich, daß der Grund für die Unfruchtbarkeit des Menschen mindestens so oft die männlichen Keimzellen waren, wie ein Defekt der Eizellen. Bis vor kurzem wurden die männlichen Keimzellen nicht so gründlich untersucht, wie die weiblichen Eizellen, wo die Unregelmäßigkeit der Periodizität leicht bemerkbar ist und die Aufmerksamkeit auf die eventuellen Störungen richtet. Außerdem ist die Spermatologie für die Tierzucht von großer Bedeutung, denn durch die Forschung und Kenntnis der Spermien kann man das Material für die künstliche Besamung sichern.

Alle diese Umstände trugen zur Erhöhung des Interesses bei und führten zum Wunsch des Austausches der Meinungen, wodurch die Forschung weiteren Antrieb erhalten könnte. Auf Grund dieser Erwägung fand es die Ungarische Akademie der Wissenschaften für richtig, ein solches Symposium zu organisieren, das den verschiedenen Fachleuten, Ärzten und Nicht-Ärzten Gelegenheit gibt, ihre Meinungen auszutauschen, und bei welchem die Beschäftigung mit einem streng begrenzten Thema zum erfolgreichen Fortschritt der Frage beiträgt. Die Bewegung der Spermien und ihr Zusammenhang mit der eigenartigen Struktur, mit dem besonderen und von dem anderer Zellen abweichenden Charakter der Spermien, ist eine jener Fragen, welche in engem Zusammenhang mit der Bestimmung der Befruchtungsmöglichkeit stehen. Dieses Thema ist also ohne Zweifel eines von jenen, welche am meisten Interesse beanspruchen können. Der Band erscheint in der Serie »Symposia Biologica Hungarica« der Ungarischen Akademie der Wissenschaften. Es ist äußerst zu bedauern, daß es erst nach vier Jahren in die Hände der Leser gelangen kann. Das Erscheinen wurde durch den Wunsch verzögert, auch die Diskussion zu publizieren, was aber leider letzten Endes nicht gelang. Das im Band enthaltene Material ist jedoch noch heute aktuell und wenn auch das Eine oder Andere von der Forschung bereits überholt ist, können im Grunde diejenigen, die sich für das Thema interessieren, die Seiten dieses Werkes mit Nutzen durchblättern.

Budapest, 1. September, 1964

Prof. Dr. I. Törő

TEILNEHMERVERZEICHNIS

A. BABICS	Urologische Klinik, Medizinische Universität, Budapest
C. BALLERIO	Primarius des Institutes «Regina Elena», Milano
J. BECZE	Forschungsinstitut für Tierzucht, Budapest
R. BUDVÁRI	Institut für Gerichtliche Medizin, Medizinische Universität, Pécs
R. DOEFFMER	Universitäts-Hautklinik, Bonn
J. HYNIE	Sexologisches Institut der Karls-Universität, Prag
MADELEINE MAICANESCO	Institut für Endokrinologie »Prof. C. I. Parhon«, Bukarest
I. MÉSZÁROS	Forschungsinstitut für Tierzucht, Budapest
L. MÓCSY	Hochschule für Veterinärmedizin, Budapest
J. MOLNÁR	Urologische Klinik, Medizinische Universität, Budapest
Z. PÓSZALAKY	Morphologische Abteilung, Institut für Experimentelle Medizin der Ungarischen Akademie der Wissenschaften, Budapest
T. RUČKI	I. Klinik für Geburts- und Frauenheilkunde, Medizinische Akademie, Poznan und Institut für Histologie und Embryologie, Medizinische Akademie, Poznan
W. SANDRITTER	Pathologisches Institut der Universität, Gießen
I. TÖRŐ	Institut für Histologie und Embryologie, Medizinische Universität, Budapest

VERÄNDERUNGEN DER MOTILITÄT DER SPERMIIEN DURCH EINIGE ÄUSSERE UND INNERE EINFLÜSSE

J. HYNIE

SEXOLOGISCHES INSTITUT DER KARLS-UNIVERSITÄT, PRAG

Zusammenfassung

Für das Studium der Beweglichkeitsveränderungen der Spermien wurde von uns eine modifizierte Methode nach BAKER u. Mitarb. angewandt. Hierbei wird die Übertrittsdauer von 100 Spermien über eine Grenzlinie zwischen zwei kleinen Quadraten einer Zählkammer gemessen und aus dieser bzw. der Spermien-dichte ihre mittlere Geschwindigkeit errechnet. Bei manchen Untersuchungen genügt es, nur die Übertrittsdauer oder deren reziproke Werte, den sog. Propul-sivitätsindex zu vergleichen.

Auf diese Weise konnten wir feststellen, daß bei Zimmertemperatur die Spermienmotilität noch 2—4 Stunden nach der makroskopischen Verflüssigung steigt und erst dann absinkt. Nach Verdünnung mit verschiedenen isotonschen, nicht störend eingreifenden Flüssigkeiten wurde die Motilität in den meisten Fällen erheblich gesteigert. Weiter wurde der störende Einfluß der Hypo- und Hypertonie sowie die Wirkung niedriger bzw. hoher pH-Werte studiert. Das Eja-kulat verträgt bei ruhigem Kontakt sogar 15%ige HCl, die spontan nicht tiefer eindringt und im Ejakulatzentrum die Spermienbeweglichkeit nur wenig beein-flußt. Nach Durchmischung geht diese jedoch — ebenso wie bei quasi isotonscher HCl — schnell wieder verloren. In der letztgenannten Säure bewegen sich die Spermien nach teilweiser Neutralisation mit isotonscher Na_2HPO_4 längere Zeit.

Toxische Substanzen aus *Trichomonas vaginalis*-Kulturen setzen die Sper-mienbeweglichkeit herab.

Für Antikonzeptionsmittel bestimmte, künstliche toxische Substanzen sollten in isotonschen und teilweise neutralisierten Lösungen auf ihre spermiziden Eigenschaften geprüft werden. Bei halbflüssigen Antikonzeptionsmitteln können wir nicht mit ihrem Eindringen in das Ejakulat rechnen und müssen deshalb beide Medien kurz vermischen.

Mit Hilfe dieser Methode kann man auch die Wirkung innerer, besonders jedoch hormonaler Einflüsse auf die Spermienbeweglichkeit studieren. Über diesbezügliche definitive Resultate können wir jedoch einstweilen nicht berichten.

Einführung

In meinem kurzen Referat möchte ich besonders über die Erfassungs-möglichkeiten von Beweglichkeitsveränderungen der Spermien berichten und hierbei betonen, daß eine objektive Untersuchungsmethode der Spermatozoen-motilität mehr aussagen kann, als die bloße Angabe des Prozentsatzes mobiler Spermien bzw. die subjektive Schätzung der Motilitätsstufen. Aus vielen, bereits vorliegenden guten objektiven Methoden wählte ich jene, die einfach und wenig anspruchsvoll ist und somit leicht bei experimentellen Unter-suchungen und in der ärztlichen Praxis angewandt werden kann. Auch sollte sie mehr als nur die Beweglichkeit einzelner Spermien ausdrücken.

Aus diesem Grunde entschied ich mich für die Methode der Spermien-
geschwindigkeitsuntersuchung bei Stieren nach BAKER, CRAGLE, SALISBURY
und VAN DEMARK, die jedoch für die ärztliche Praxis modifiziert und vereinfacht
werden mußte.

Methodik

Wir beobachten das verflüssigte, unverdünnte menschliche Sperma bei
Zimmertemperatur in einer Zählkammer und achten darauf, wie bewegliche
Spermien in zwei angrenzenden kleinen Quadraten die Grenzlinie in beiden
Richtungen durchtreten; mit einer Stoppuhr wird die Zeit bestimmt, die 100
Spermien benötigen, um diese Grenzlinie zu durchkreuzen. Aus dieser Zeit
und der Durchtrittsöffnung, die von der Länge der Grenzlinie und der Tiefe
der Zählkammer abhängig ist, können wir für eine bestimmte Zahl von Spermien
in 1 cm³ deren mittlere Geschwindigkeit berechnen. Die Grenzlinie mißt regel-
mäßig 0,05 mm, die Tiefe der Zählkammer 0,10 mm, 0,05 mm oder 0,02 mm.
Die letzte seichteste Kammer eignet sich am besten, ist jedoch seltener im
Handel. Für Zählkammern von 0,05 mm Tiefe kann die Berechnung der
mittleren Spermengeschwindigkeit nach folgender Formel durchgeführt
werden:

$$c = \frac{N \cdot \frac{1}{\sin 45^\circ} \cdot 60}{d \cdot q \cdot t} = \frac{100 \cdot 1,40 \cdot 60}{\frac{1}{400} \cdot d \cdot t} = \frac{3\,360\,000}{\text{spz/mm}^3 \cdot t} = \frac{3\,360}{\text{spz}_m \cdot t} = \frac{56 P_i}{\text{spz}_m}$$

- c* — mittlere Geschwindigkeit in Minuten
d — Spermatozoen in mm³
q — Querschnitt der Durchtrittsöffnung
t — Zeit des Durchtrittes von 100 spz(N) in sec
T — Zeit in Minuten
spz_m — Millionen von Spermien in 1 cm³

$$P_i = \frac{1}{T} = \frac{60}{t/\text{sec}} \text{ — Propulsivitätsindex}$$

Für den Durchtritt und die erreichte Entfernung von 1 mm einer
bestimmten Spermienzahl in 1 mm³ durch die 1×1 mm messende Öffnung
muß eine bestimmte Zeit vorausgesetzt werden, wenn man eine geradlinige
und gleiche Bewegungsrichtung annimmt. Bei einer kleineren Öffnung wird
demnach nur eine kleinere Zahl von Spermien den gleichen Weg zurück-
legen. Die so gewonnenen Daten ermöglichen also die Propulsivitätsberechnung
einer geradlinigen Bewegung. Da sich jedoch die Spermien in ver-
schiedenen Richtungen bewegen, verwenden wir bei der Berechnung der wirk-
lichen mittleren Propulsivität, die größer ist als dem Übertritt entspricht,
einen Korrekturfaktor, d. h., wir dividieren diese durch den Sinus von 45°.

Um die *Pp*-Prozente der Propulsivität zu bestimmen, genügt es bei einer
konstanten Spermienzahl die Durchtrittszeit von 100 Spermien zu vergleichen.
Sonst bedeuten reziproke Werte der Durchtrittszeit einen wichtigen Beurteilungs-
faktor des Ejakulates, den wir Propulsivitätsindex, *P_i* nennen. Der
Propulsivitätsindex bestimmt den Wert des Ejakulates ausgedrückt durch

die Spermiedichte und -motilität, d. h. gleichzeitig durch zwei Faktoren, die sich in bestimmter Weise ergänzen können. Bei qualitativ hervorragendem Ejakulat beträgt P_i beiläufig 1,0—0,5, bei noch gutem Ejakulat P_i — 0,50 bis 0,20.

Wenn wir eine Zählkammer von 0,02 mm Tiefe benützen, nehmen wir für Berechnung des P_i die Durchtrittszeit von 40 Spermien.

Anwendung der Methode

Motilitätsveränderungen der Spermatozoen nach der Ejakulation

Mit dieser Methode könnten wir zeigen, daß die Propulsivität der Spermien nach erfolgter makroskopischer Kolliquation noch einige Stunden wächst oder schwankt und erst dann allmählich absinkt (Tab. 1).

Die Propulsivität in 10 beliebig ausgewählten Ejakulaten stellte sich in Propulsivitätsprozenten ausgedrückt wie folgt dar: nach Kolliquation 100%, nach 1 weiteren Stunde 125%, nach 2½ Stunden 113%, nach 4 Stunden 106%. Solch feine Unterschiede kann man bei bloß subjektiver Schätzung begreiflicherweise nicht feststellen.

Also die mittlere Propulsivität der Spermien wächst bei Zimmertemperatur noch einige Stunden nach der Verflüssigung.

Tabelle 1

Ejakulat — 5,8 cm³ mit 172 Mil/cm³

		Unmittelbar	Nach 40'	Nach 1 Std. 40'	Nach 3 Std.	Nach 4 Std.
Rein nach Verflüssigung	t	86"	81"	71"	80"	77"
	Pp	100%	106%	121%	107%	111%
Mit physiol. NaCl-Lösung 0,3 : 0,1	t	72"	69"	75"	92"	76"
	Pp	119%	125%	115%	93%	113%
Verdünnt 0,2 : 0,2	t	74"	81"	83"	103"	158"
	Pp	116%	106%	104%	83%	54%
Verdünnt 0,1 : 0,3	t	94"	100"	106"	153"	181"
	Pp	91%	86%	81%	56%	47%

t — Durchtrittszeit
Pp — Prozente der Propulsivität

Die Verdünnung des Ejakulates

Bei Verdünnung des Ejakulates mit nicht schädigenden isotonischen Lösungen stieg die Durchgangszeit einer bestimmten Spermienmenge nicht proportional mit dem Grade der Verdünnung, sondern wesentlich langsamer;

also die Beweglichkeit der Spermien ist größer geworden (Tab. 1). So erreichte z. B. die mittlere Geschwindigkeit bei einer Verdünnung mit isotonischer Kochsalzlösung im Verhältnis 1 : 3 sogar 300% des Ausgangswertes, aber sank dann schneller.

Verschiedene Lösungsmittel regen natürlich die Beweglichkeit der Spermien in verschiedener Weise an. Von den Chloriden der Kationen Na^+ , K^+ , Ca^{++} , Mg^{++} ist dies besonders das MgCl_2 (Magnesiumchlorid). Kalziumfreie Ringer-Lösung bewährte sich uns unter mehreren zusammengesetzten künstlichen Lösungsmitteln besonders gut. Zur Neutralisation von Säuren leistete uns das isotonische bibasische Natriumphosphat (Na_2HPO_4) sehr gute Dienste. Nach Mischung mit isotonischen Salz-, Essig-, Milch- und Zitronensäurelösungen hörte die Beweglichkeit der Spermien rasch auf, blieb jedoch bei teilweiser Neutralisation mit 1–3 Teilen isotonischer Na_2HPO_4 noch lange erhalten, wenn das pH bis etwa zu 5 anstieg. Das pH ist wichtiger als die Zusammensetzung der Säure. Die Borsäure brauchte nicht so viel Zusatz. Bei bloßem Kontakt des Ejakulates mit den angeführten Säuren drangen jedoch dieselben nicht allzusehr in die Ejakulatmasse ein und deshalb blieb die Beweglichkeit hinter der Grenzschicht fast unverändert. Auch 15% Salzsäure dringt bei bloßer Anlagerung nicht schnell in die Ejakulatmasse ein und erzeugt auf ihrer Oberfläche eine schützende Schicht. Bei Durchmischung tötet jedoch eine solch konzentrierte Salzsäure die Spermien sofort. In solcher Weise müssen wir die Angaben in der Literatur verstehen, daß die Spermien starke HCl besser vertragen als schwache. Auch isotonische Kalilauge und Natronlauge verhalten sich ähnlich.

Gleichfalls *hypotonische Lösungen* wie z. B. destilliertes Wasser und *hypertonische* Lösungen verhalten sich bei einfacher Zugabe oder nach der Mischung in ähnlicher Weise. Nach Durchmischung mit Überschuß der stark hypotonischen oder hypertonischen Flüssigkeit schwindet die Beweglichkeit sehr schnell.

Kolloidstoffe wie z. B. Gummi acaciae oder agar können in isotonischen Lösungen gelöst, die Beweglichkeit in gewisser, jedoch nicht allzu ausdrucksvoller Weise hemmen. Auf der anderen Seite können Kolloidstoffe die störende Wirkung schädigender Ionen beschränken.

Die Isotonie und Neutralisation spielen bei der Prüfung *toxischer* Wirkstoffe eine wichtige Rolle, besonders aber solcher, die zur Antikonzeption verwendet werden sollen. Manche geläufig als toxisch angesehenen Mittel zeigten sich in isotonischer Lösung und bei nicht zu hohem oder niedrigem pH eigentlich *wenig toxisch*.

Bei der Prüfung halbflüssiger *Antikonzeptionsmittel* (der Antikonzeptionsgelee) rechnen wir damit, daß sie ohne das Wirken einer dritten Kraft, in der Regel nur schwer in das Ejakulat eindringen. Wir vermischen sie deshalb mit dem Ejakulat unter Benützung eines Glasstäbchens von ca. 6 mm Durchmesser, das in einer Epruvette von 8 mm Weite nur einmal gedreht wird. Auf diese Art versuchten wir die sub coitum stattfindende leichte Durchmischung nachzuahmen.

Mit Hilfe der oben angeführten Methode prüften wir auch *Toxine von Mikroorganismen*, besonders die des *Trichomonas vaginalis*. Der Nährboden CPLM (Zystein-Pepton-Leber-Maltose mit Kaninchenserum, Penicillin und Streptomycin) verringerte die Propulsivität im Vergleich zu kalziumfreiem Ringer auf 77%, die *Trichomonas vaginalis*-Kultur aus gleichem Nährboden

auf 56%, und zerquetschte *Trichomonas vaginalis*-Kulturen mit Endoxinen bis auf 34%. Solche Unterschiede kann man bei subjektiver Beobachtung nicht ausreichend bewerten.

Besprechung

Wie erwähnt, kann die Originalmethode von BAKER und Mitarb. für die angeführte klinische und experimentelle Praxis nicht benützt werden. Als erheblicher Störungsfaktor für die Beurteilung der Spermienbeweglichkeit sei besonders die Verdünnung erwähnt. Weiter braucht man nicht immer die mittlere Propulsivität berechnen, und es genügt sehr oft nur der Vergleich der Durchgangszeiten, Prozent der Propulsivität (Pp).

Ich habe versucht mit dieser Methode auch die Veränderungen der Spermienbeweglichkeit durch innere Einflüsse und besonders die Wirkung der Hormontherapie zu verfolgen. Ich habe besonders die Therapie mit kleinen Dosen von Androgenen gleichzeitig mit sehr kleinen Östrogendosen in 14tägigen Stößen probiert. Da ich bisher nicht genug Fälle (34) und nicht für genug lange Zeit beobachten konnte, sei hier nur vorläufig erwähnt, daß sich bei manchen Patienten die Qualität bzw. die Motilität des schwachen Spermas nach dieser von HEROLD inaugurierten Methode besserte.

Gemäß der an unserem Institut von RABOCH und HOMOLKA bei verschiedenen histologischen Hodentypen durchgeführten Ejakulatmengen und Phosphatasenstudien scheint nicht nur das Testosteron aus Leydigischen Zellen, sondern noch ein anderer testikulärer Wirkstoff und wahrscheinlich auch das hypophysäre Prolaktin an der Spermiogenese und Beweglichkeit maßgeblich beteiligt zu sein.

LITERATUR

BAKER, F. N., CRAGLE, R. G., SALISBURY, G. W., VAN DEMARK, N. L. (1957), Spermatozoan velocities in vitro. *Fertil. and Steril.*, **8**, 149.

ASPECTS PARTICULIERS DE LA CYTODYNAMIQUE NÉMASPERMIQUE «IN VITRO»

A. GIAROLA et C. BALLERIO

INSTITUT «REGINA ELENA», MILANO

Résumé

L'étude cyto-dynamique des spermatozoïdes «in vitro» montre que l'apport expérimental de certaines solutions spermio-isotoniques du type de la solution de Ringer-phosphates à un pH de 7,4, entraîne une activation biochimique des cellules séminales et une augmentation notable de leur survie (jusqu'à 180 heures à une température constante de 20 degrés Celsius, avec une survie moyenne de 120 heures). Ces valeurs ne subissent pratiquement aucun changement après addition d'autres substances à des concentrations données (acides aminés, antibiotiques, vitamines).

Ces résultats expérimentaux sont applicables en clinique dans certains cas bien déterminés.

Introduction

Avant de vous parler de certains aspects particuliers de la cytodynamique némaspermiqve «in vitro» formant le but de notre bref exposé, je voudrais ouvrir une parenthèse sur les deux limitations fondamentales qui règnent encore dans le domaine de ces recherches, et qui trop souvent provoquent des erreurs d'interprétation.

Tout d'abord, les connaissances imparfaites que nous avons encore sur l'action immédiate et médiate des solutions communément employées pour maintenir et stimuler le mouvement cellulaire, ou pour le réveiller, s'il était assoupi, et ensuite l'imprécise évaluation mécanique de la cinétique némaspermiqve.

L'opinion des différents chercheurs n'est pas à ce sujet unanime; les uns l'attribuent à l'influence humorale du milieu, c'est à dire à la concentration hydrogénionique et à l'action des ions sur les éléments contractiles de la queue du spermatozoïde ou à la présence de carbohydrates glycolysables; d'autres l'attribuent à la conformation asymétrique de la queue et à la présence, ainsi qu'à la position de ce que l'on appelle la goutte protoplasmatique; d'autres enfin l'attribuent à la contraction et à la décontraction du filament axile.

Voilà pourquoi, dans la pratique, lorsque nous considérons le type, le degré, la qualité, la durée et la variété du mouvement, nous pouvons même nous éloigner de nos conceptions.

C'est à ces aspects que nous limitons l'évaluation de la dynamique némaspermiqve, car nous estimons en définitive qu'ils peuvent réellement résumer le problème tout entier.

En ce qui concerne le type, nous tenons uniquement compte dans nos recherches des trois variétés de mouvement:

1° *mouvement de propulsion* (celui dans lequel les queues dessinent

alternativement, dans un sens ou dans l'autre, des courbes latérales avec le déplacement en avant qui en dérive);

2° *mouvement latéral ou ondulatoire* (par des déplacements lents et latéraux de la queue, et parfois par des séries de vibrations sur les différents plans ou même par des secousses provoquant des sursauts plus ou moins vifs). Cette attitude exprime toujours une vitalité réduite ou des conditions d'ambiance défavorables, mais elle peut également faire prévoir un réveil imminent de l'état dynamique jusqu'alors assoupi, comme dans le cas de la conservation «a frigore»;

3° *mouvements rotatoires* (avec des déplacements de compensation in loco, sur un diamètre plus ou moins réduit et à une vitesse variable, ce qui exprime des conditions vitales défavorables irréversibles).

Nous évaluons en pourcentages le degré du mouvement, étant donné que l'appréciation est plus ou moins favorable, en raison du fait qu'une activité énergétique et vive prévaut sur les autres types de mouvements (oscillatoire-rotatoire), que dans le domaine expérimental nous groupons sous l'appellation de «mouvements non progressifs».

La qualité du mouvement doit être considérée afin de rechercher les influences plus ou moins effectives des moments physico-chimiques (en particulier mécaniques), alors que pour la diversité du mouvement on devra tâcher de savoir si celle-ci est spontanée ou provoquée.

On doit enfin concevoir la durée du mouvement, par l'intermédiaire d'examen répétés toutes les 12 heures jusqu'à l'épuisement total de toute activité cinétique, comme une survivance exprimée aussi bien par la totalité des heures à mouvement progressif que par un indice de survivance qui tient compte également des variations des pourcentages entre une observation et l'autre.

Méthodes

Dans nos expériences nous avons examiné la survivance in vitro,* sous une température constante de +20° du sperme naturel et du sperme additionné, dans la proportion de 1 à 10, de sérum homologue, sérum hétérologue, solutions salines et glucosales à pH variable** (solution saline Ringer-bicarbonate, solution glucosaline Ringer-bicarbonate, solution glucosaline magnésique, solution glucosaline gélatinée) et à pH constant (solution glucosaline Ringer-phosphate, solution glucosaline type Baker), avec l'adjonction expérimentale d'une dilution appropriée, d'amino-acides, d'antibiotiques, de sulfamides et de vitamines.

$$* S = \frac{1}{10} at = \frac{a_1 t_1 + a_2 t_2 + a_3 t_3 + \dots + a_{n-2} t_{n-2} + a_{n-1} t_{n-1} + a_n t_n}{10} \quad \text{où}$$

$a_1, a_2, a_3 \dots a_{n-2}, a_{n-1}, a_n$ = activité cinétique exprimée par la méthode des dixièmes,
 $t_1 t_2 t_3 \dots t_{n-2} t_{n-1} t_n$ = fractions de temps entre 2 observations successives pendant lesquelles on attribue une activité constante au sperme.

** *Solut. salines et glucosales à pH variable :*

A) Solut. saline Ringer-bicarb. (pH = 6,0)

Solut. Ringer-NaHCO ₃	2,5x 10 ⁻² mole/litre
NaCl	solut. 0,154 M cc 100,0
KCl	" 0,154 M " 2,0
CaCl ₂ (anhydre)	" 0,110 M " 2,0
NaHCO ₃	" 0,154 M " 20,0

B) Solut. glucosaline Ringer-bicarb. (pH = 6,0)

Solut. Ringer-NaHCO ₃	2,5x 10 ⁻² mole/litre, lévulose 0,2%
NaCl	solut. 0,154 M cc 100,0
KCl	" 0,154 M " 2,0
CaCl ₂ (anhydre)	" 0,110 M " 2,0

	NaHCO ₃	solut.	0,154 M	cc	20,0
	lévulose (Merck)		10%	„	2,5
C) Solut. glucosaline	magnésique (pH = 6,2)				
	NaCl	solut.	0,154 M	cc	100,0
	KCl	„	0,154 M	„	4,0
	CaCl ₂ (anhydre)	„	0,110 M	„	3,0
	NaHCO ₃	„	0,154 M	„	21,0
	MgSO 4 · 7 H ₂ O	„	0,154 M	„	1,0
	lévulose (Merck)		10%	„	2,6
D) Solut. glucosaline	gélatinée (pH = 5,8)				
	NaCl			gr	0,900
	KCl				0,018
	CaCl ₂ (anhydre)				0,200
	Peptone Witte				1,250
	gélatine				1,250
	lévulose (Merck)				2,500
	H ₂ O distillée			cc	100,00
E) Solut. saline et	glucosaline à pH constante				
	Solut. glucosaline Ringer-phosphate (pH = 7,4)				
	NaCl	solut.	0,154 M	cc	100,0
	KCl	„	0,154 M		2,0
	CaCl ₂ (anhydre)	„	0,110 M		2,0
	NaHCO ₃	„	0,154 M		20,0
	tampon phosph.		0,109 M ¹		10,0
	lévulose (Merck)		10%		2,7
F) Solut. glucosaline	type Baker (pH = 7,6)				
	NaCl			gr	0,20
	Na ₂ HPO ₄				0,60
	KH ₂ PO ₄				0,01
	lévulose (Merck)				3,00
	H ₂ O distillée			cc	100,00
	¹ Na ₂ HPO ₄ gr 1,268 — NaH ₂ PO ₄ gr 0,243 — H ₂ O distillée			cc	1000,0

Résultat et discussion

Comme solution spermioisotonique ayant une durée de survivance moyenne de 120 heures, la solution glucosaline Ringer-phosphate s'est démontrée vraiment idéale; ensuite la solution glucosaline magnésique (environ 120 heures) et enfin les solutions glucosalines type Baker et Ringer-bicarbonate (108 heures). En ce qui concerne les temps les plus longs, nous avons obtenu le classement suivant: solution glucosaline Ringer-phosphates et type Baker (180 heures), solution glucosaline Ringer-bicarbonate (168 heures), solution magnésique (144 heures) et enfin solution saline Ringer-bicarbonate (132 heures).

Malheureusement le peu de temps que nous avons à notre disposition ne nous permet pas d'examiner les particularités parfois très intéressantes des résultats expérimentaux que nous avons recueillis. Nous pouvons seulement dire que l'adjonction expérimentale d'acides-amino s'est démontrée, par ordre décroissant, plus favorable pour l'arginine (0,1), la glyco-colle (0,1) et la L-lysine (0,1) avec des valeurs moyennes allant de 110 à 105 heures, et des valeurs maxima allant de 144 à 120 heures.

L'adjonction d'antibiotiques a donné les résultats représentés dans tableau 2.

Dans l'ensemble pour évaluer l'influence sur la cytodynamique némaspermique in vitro de l'adjonction expérimentale de quelques solutions spermioisotoniques et de certaines substances additives (acides-amino, antibiotiques,

Tableau 2
Effet des aminoacides

Sperme additionné 1:10 avec solutions glucosaline, Ringer-phosphates aminoacides	Dilution	Cas N°	Durée de survivance			Indices de survivance		
			moyenne	minima	maxima	moyenne	minima	maxima
Glycocolle	0,1	18	105	72	120	3,91	3,40	5,65
	0,01	18	102	72	108	3,50	3,15	5,32
ms-Alanine	0,1	12	98	24	108	2,95	0,86	5,50
	0,01	12	65	24	120	2,82	0,86	5,63
Acide aminobutyrique	0,1	8	24	12	72	1,65	0,45	3,12
	0,01	8	26	24	72	1,78	0,87	3,48
ms-Thréonine	0,1	12	68	24	108	2,38	0,86	3,85
	0,01	12	86	48	108	2,89	1,72	3,90
ms-Valine	0,1	18	78	48	108	2,70	1,75	3,68
	0,01	18	95	72	108	3,70	3,09	3,80
ms-Norvaline	0,1	12	24	12	72	1,64	0,40	3,10
	0,01	12	26	24	72	1,75	0,84	3,50
ms-Leucine	0,1	12	46	24	84	2,10	0,85	3,48
	0,01	12	42	24	72	1,06	0,79	3,02
ms-Isoleucine	0,1	12	46	24	72	2,05	0,94	3,46
	0,01	12	46	24	72	2,02	0,90	3,28
ms-Norleucine	0,1	12	50	24	72	2,09	0,80	3,25
	0,01	12	52	24	72	1,98	0,86	3,11
ms-Sérine	0,1	18	75	48	108	2,90	1,61	3,85
	0,01	18	75	48	108	2,77	1,65	3,80
L-Ornithine	0,1	18	18	12	72	1,02	0,35	3,46
	0,01	18	26	24	72	1,78	0,84	3,50
L-Arginine	0,1	18	110	72	144	3,85	3,40	5,95
	0,05	18	102	72	120	3,52	3,04	5,64
	0,01	12	100	72	120	3,50	3,10	5,60
	0,005	12	100	72	108	3,45	2,85	5,45
ms-Citrulline	0,1	8	70	36	108	2,66	1,20	3,82
	0,01	8	68	36	108	2,32	1,18	3,65
L-Lysine	0,1	12	105	72	120	3,75	2,98	5,70
	0,01	12	100	60	108	3,48	2,95	5,41
Acide-L-aspartique	0,1	8	78	48	108	2,70	1,65	3,91
	0,01	8	85	60	108	3,50	3,05	3,94
Acide-L-glutamique	0,1	8	46	24	72	2,35	0,86	3,58
	0,01	8	46	24	72	2,05	0,85	3,45
Acide-L-oxyglutamique	0,1	8	46	24	72	2,05	0,82	3,46
	0,01	8	46	24	72	2,30	0,86	3,58
L-Cystéine	0,1	12	46	24	84	2,06	0,80	4,48
	0,01	12	46	24	48	1,74	0,88	1,85

Sperme additionné 1 : 10 avec solutions glucosaline, Ringer-phosphates, aminoacides	Dilution	Cas N°	Durée de survivance			Indices de survivance		
			moyenne	minima	maxima	moyenne	minima	maxima
ms-Méthionine	0,1	12	42	24	72	2,02	0,86	3,40
	0,01	12	46	24	48	1,74	0,86	1,80
ms-Phénilalanine	0,1	8	42	24	72	2,10	0,88	3,41
	0,01	8	32	24	48	1,02	0,50	1,68
ms-Tryptophane	0,1	8	32	12	48	1,12	0,65	1,65
	0,01	8	42	12	72	2,06	0,85	3,22
L-Histidine	0,1	18	78	24	108	2,85	1,70	3,84
	0,01	18	94	48	108	3,50	3,02	3,82
L-Proline	0,1	8	65	72	108	2,32	1,20	3,80
	0,01	8	70	36	108	2,64	1,22	3,75
L-Oxyproline	0,1	12	46	36	48	1,74	0,88	2,02
	0,01	12	42	24	72	1,08	0,85	2,96

Nous référant à l'indice de survivance, nous avons comme valeurs moyennes: glyocolle 0,1: 3,91; L-arginine 0,1: 3,85; L-lysine 0,1: 3,75; ms-valine 0,01: 3,70; L-arginine 0,05: 3,52. Et comme valeurs maxima: L-arginine 0,1: 5,95; L-lysine 0,1: 5,70; glyocolle 0,1: 5,65; L-arginine 0,05: 5,64; ms-alanine 0,01: 5,63.

L'adjonction d'antibiotiques (tabl. 3) a donné les résultats suivants: comme valeurs moyennes la dihydrostreptomycine base 0,05: 120 heures; le chloroamphénicol simple 0,05: 110 heures; la pénicilline G-potassique et sodique 0,315, la tétracycline chlorhydrate 0,005 et la terramycine 0,0025: 107 heures. Comme valeurs maxima: la tétracycline 0,005, la terramycine 0,0025 et l'auréomycine 0,005: 168 heures; la dihydrostreptomycine 0,05 et la pénicilline 0,315: 156 heures.

Les indices de survivance donnent comme valeurs moyennes pour la dihydrostreptomycine 0,05: 4,25; pour la pénicilline 0,315: 3,90; pour l'auréomycine 0,005: 3,84; pour la tétracycline 0,005: 3,80; pour le chloroamphénicol 0,05: 3,78. Les valeurs maxima sont: pour la pénicilline 0,315: 5,85; pour l'auréomycine 0,005: 5,78; pour la dihydrostreptomycine 0,05: 5,75; pour la tétracycline 0,005: 5,70; pour la streptomycine base 0,05: 5,62.

Les vitamines (tabl. 4) ont donné les valeurs moyennes suivantes: pour la niacine 0,01: 112 heures et 0,1: 105 heures; pour l'acide ascorbique 0,001: 99 heures; pour la pyridoxine 0,1: 98 heures; pour l'acide pantothénique 0,0001: 86 heures. Les temps maxima sont: pour la pyridoxine 0,1: 168 heures; pour la niacine 0,1 et 0,01; pour l'acide ascorbique 0,01 et 0,0001: 120 heures. Comme indices de survivance moyens pour la niacine 0,01: 4,62 et 0,1: 3,84; pour l'acide ascorbique 0,001: 3,68; pour la pyridoxine 0,1: 3,65. Les maxima sont: pour la pyridoxine 0,1: 6,52; pour la niacine 0,01: 5,82 et 0,1: 5,70; pour l'acide ascorbique 0,0001: 5,61 et 0,01: 3,92.

Pour évaluer dans l'ensemble l'influence sur la cytodynamique némaspermiqne in vitro de l'addition expérimentale de certaines solutions spermio-

Tableau 3

Effet des antibiotiques ou sulfamides

Sperme additionné à solution glucosaline Ringer-phosphates et antibiotiques ou sulfamides	Dilution	Cas N°	Durée de survivance			Indices de survivance		
			moyenne	minima	maxima	moyenne	minima	maxima
Pénicilline G-potassique et sodique	0,630% (1000 U.O/cc)	12	105	48	120	3,50	2,35	5,65
	0,315% (500 U.O/cc)	12	107	48	156	3,80	1,85	5,85
Dihydrostreptomycine base (sulfate)	0,05% (500 gr/cc)	12	120	72	156	4,25	3,30	5,75
	0,01% (100 gr/cc)	12	102	72	120	3,50	3,24	5,14
Streptomycine base	0,05% (500 gr/cc)	12	103	60	144	3,70	2,78	5,62
	0,01% (500 gr/cc)	12	101	72	120	3,45	3,18	5,18
Chloroamphénicol	0,05% (500 gr/cc)	12	110	72	144	3,78	2,98	5,41
	0,01% (100 gr/cc)	12	100	72	120	3,25	2,75	5,10
Tétracycline (chlorhydrate)	0,005% (50 gr/cc)	12	107	48	168	3,80	1,65	5,70
	0,0025% (25 gr/cc)	12	100	48	120	3,36	1,75	5,24
Terramycine (oxitétracycline chlorhydrate)	0,005% (50 gr/cc)	12	105	48	120	3,55	2,25	5,35
	0,0025% (25 gr/cc)	12	107	48	168	3,74	2,05	5,60
Auréomycine (chlor-tétracycline chlorhydrate)	0,005% (50 gr/cc)	12	106	48	168	3,84	2,18	5,78
	0,0025% (25 gr/cc)	12	100	48	120	3,50	2,40	5,20
Érythromycine	0,005% (50 mg/cc)	12	105	48	120	3,22	2,25	5,05
	0,0025% (25 mg/cc)	12	100	48	108	2,74	1,65	3,95
Bacitracine	0,005% (50 gr/cc)	12	105	48	120	3,18	2,17	4,98
	0,0025% (25 gr/cc)	12	100	48	108	2,92	1,75	4,05
Trisulfamides (sulfadiazine, sulfamerazine, sulfamétazine)	0,5% (0,003 gr/cc)	12	85	60	108	2,05	1,75	3,25
	0,1% (0,001 gr/cc)	12	100	48	120	2,80	1,60	4,05

Tableau 4

Effet des vitamines

Sperme additionné à solution Ringer-phosphates et vitamines	Dilution	Cas N°	Durée de survivance			Indices de survivance		
			moyenne	minima	maxima	moyenne	minima	maxima
Tiamine (Vit. B 1)	0,01	12	84	48	108	2,95	1,72	3,90
	0,001	12	76	48	96	2,50	1,70	3,25
Riboflavine (Vit. B 2)	0,001	12	65	36	108	2,32	1,20	3,82
	0,0001	12	70	36	108	2,65	1,20	3,88
Pyridoxine (Vit. B 6)	0,1	12	98	24	168	3,65	0,88	6,52
	0,01	12	75	48	108	2,92	1,70	3,86
Niacine (Vit. PP)	0,1	12	105	72	120	3,84	3,40	5,70
	0,01	12	112	72	120	4,62	3,42	5,82
Biotine (Bios II)	0,01	12	46	24	72	2,05	0,82	3,48
	0,001	12	46	24	72	2,30	0,86	3,56
Acide pantothénique (comme sel de calcium)	0,01	12	50	24	72	2,04	0,80	3,24
	0,001	12	86	48	108	2,89	1,72	3,90
Cyanocobalumine (Vit. B 12)	0,001	12	46	24	48	1,74	0,88	1,80
	0,0001	12	42	24	72	1,06	0,83	3,01
Acide ascorbique (Vit. C) (comme sel de sodium)	0,1	12	46	24	84	2,06	0,85	3,47
	0,01	12	78	48	110	2,84	1,72	3,92
	0,001	12	99	72	108	3,68	3,55	3,82
	0,0001	12	63	24	120	3,02	0,86	5,61
Vitamine E	0,01	12	24	12	72	1,64	0,40	3,09
	0,001	12	26	24	72	1,78	0,84	3,50
Vitamine K	0,001	8	42	24	72	2,12	0,86	3,41
	0,0001	8	32	12	48	1,02	0,50	1,68

isotoniques et de certaines substances additives (aminoacides, antibiotiques, vitamines), nous nous rapporterons aux durées et aux indices de survivance du sperme naturel maintenu dans les mêmes conditions expérimentales: temps moyen de 62 heures avec un maximum de 96 heures et un indice moyen de 2,60 avec un maximum de 3,60. Nous constatons alors que la simple adjonction des solutions glucosaline Ringer-phosphates et glucosaline magnésique a permis les durées moyennes de survivance de 120 heures et par la nouvelle adjonction, toujours des solutions glucosaline Ringer-phosphates, de dihydrostreptomycine à la dilution de 0,05 à 120 heures, de niacine 0,01 à 112 heures et de L-arginine 0,1 à 110 heures.

En exprimant ces mêmes valeurs en indices de survivance, nous avons des valeurs moyennes pour la solution Ringer-phosphates de 5,72, pour la niacine 0,01 de 4,62, pour la dihydrostreptomycine 0,05 de 4,25 et pour le glycocolle 0,1 de 3,91.

Si nous voulons par contre considérer les valeurs maxima, nous avons des temps de survivance de 180 heures pour la solution Ringer-phosphate et la glucosaline type Baker, de 168 heures pour la nouvelle adjonction de tétracycline 0,05, terramycine 0,0025, auréomycine 0,05 et pyridoxine 0,1 toujours à la solution Ringer-phosphates, et de 144 heures par l'addition de L-arginine 0,1.

Exprimés en valeurs de survivance, nous avons les indices suivants: pour la solution Ringer-phosphates: 7,72; pour la pyridoxine 0,1: 6,52; pour L-arginine 0,1: 5,95; pour la pénicilline 0,315: 5,85.

DIE SPERMAQUALITÄT BEEINTRÄCHTIGENDE EXOGENE UND ENDOGENE FAKTOREN

I. MÉSZÁROS

FORSCHUNGSINSTITUT FÜR TIERZUCHT, BUDAPEST

Zusammenfassung

Im Rahmen der Routinearbeit der Stationen für künstliche Befruchtung wurden die jahreszeitlichen Veränderungen in der Qualität der Bullenspermien beobachtet. In den Monaten Juli und August war die Spermaqualität schwächer, was auf der Sommerwärme und gesteigerten Insolation beruhte.

Von subklinischen Erkrankungen, insbesondere von den anscheinend symptomfreien Verdauungsstörungen, wird die Spermaqualität verschlechtert, durch Verabreichung von hefehaltigen Futtermitteln oder Antibiotika jedoch beträchtlich verbessert.

In der Spermaproduktion eines Bestandes von 50 Bullen war zunehmende Verschlechterung eingetreten. Die Spermien bewegten sich einwandfrei, tolerierten aber nicht die Verdünnung. Es entwickelte sich ein anabiotischer Zustand, als dessen Ursache die vegetative Erschöpfung der Bullen festgestellt werden konnte. Aus betriebstechnischen Gründen hatte man die Ruhezeit der Bullen verkürzt, dabei aber verrichteten sie die übliche Bewegung und Arbeit. Die vegetative Erschöpfung hatte sich in 6—7 Monaten entwickelt und konnte durch Erhöhung der Ruhezeit in wenigen Wochen behoben werden.

Die künstliche Befruchtung kommt in zahlreichen Zweigen der Tierzucht, neuerdings hauptsächlich in der Rinder- und Schafzucht ausgedehnt zur Anwendung. Im Jahre 1960 wurden etwa 65% der Bestände, ungefähr 600 000 Kühe, inseminiert. Da von einem Bullen 1200—1500, mitunter mehrere tausend Kühe befruchtet werden, erscheint es angezeigt, die Veränderungen, die in der Samenproduktion der Bullen zeitweise festzustellen sind, mit besonderer Sorgfalt zu beobachten.

In den einzelnen Stationen für künstliche Befruchtung werden unterschiedliche Trächtigkeitsergebnisse erzielt. Auch die Resultate der mit dem Sperma einzelner Bullen durchgeführten Befruchtungen sind sehr verschieden, obgleich die Haltungs-, Fütterungs- und Arbeitsverhältnisse in den einzelnen Befruchtungshauptstationen übereinstimmen. In einer dieser Stationen werden 85—90% der inseminierten Kühe trächtig, anderswo 72—75%. Innerhalb einer Hauptstation aber werden 37% der mit dem Samen eines Bullen inseminierten Kühe und 60% der mit dem Samen eines anderen befruchteten trächtig.

Bei der Auswahl der Bullen muß man daher auch die Qualität des Samens berücksichtigen. Eine richtige Selektion kommt in der Züchtung, bei der Auswahl der Bullen mit unsicherer oder schlechter Produktion zur Geltung. Die gute Befruchtungsfähigkeit ist ein zuverlässiges Zeichen für den erwünschten Zustand des Organismus.

Auch in eigenen Untersuchungen vermochten wir zu bestätigen, daß die schlechte Befruchtungsfähigkeit an den Nachkommen eines Hengstes als hereditäre Eigenschaft in Erscheinung getreten ist. Obgleich der Samen des

Stammhengstes über keine schlechte Fertilität verfügte, weil 67% der von ihm gedeckten Stuten trächtig wurden, waren seine männlichen Nachkommen durch labile bzw. ausgesprochen schlechte Befruchtungsfähigkeit, die weiblichen durch schwache Konzeption, Zyklusstörungen bzw. Anöstrus gekennzeichnet. Die Spermaproduktionsstörungen der Hengste manifestierten sich in Nekrospermie, im Erscheinen degenerierter und mißgebildeter Zellformen, in der verringerten Lebensdauer und schlechten Befruchtungsfähigkeit der morphologisch normal aufgebauten Spermien. Beachtenswert ist, daß diese Fehler nur bei den aus einzelnen bestimmten Stutenfamilien stammenden Nachkommen in Erscheinung traten, bei anderen nicht.

Bei den Störungen im Befruchtungsvermögen der männlichen Tiere handelt es sich nur zum kleineren Teil um hereditäre, zum größeren jedoch um erworbene Eigenschaften. Diese Samenproduktionsstörungen treten zum Teil vorübergehend, temporär auf. Der Organismus reagiert lebhaft auf die Umweltwirkungen, und die Qualität des Samens spiegelt getreu den Zustand des Organismus wider.

In der Samenerzeugung der Bullen sind jahreszeitliche Schwankungen zu beobachten. Im Juli und August ist die Qualität des Samens schwächer, die Libido der Bullen launenhaft. Die Qualitätsverschlechterung des Spermias geht auch aus den Laboratoriumsuntersuchungen hervor. Darüber hinaus wird das prozentuale Resultat der Insemination schwächer, was laut MANN auf der intensiveren Sonnenstrahlung, nach CSUKÁS eher auf der großen Sommerhitze beruht. Im Sommer 1960, wo sich in unserem Kontinentaklima keine längere Zeit andauernde Hitzeperiode entwickeln konnte, sind Störungen in der Samenproduktion der Bullen in der angegebenen Zeitperiode interessanterweise in geringerem Maße oder kaum zu beobachten gewesen.

Von den Umweltfaktoren üben die komplexen Wetterveränderungen auf das geschlechtliche Verhalten der männlichen Tiere und auf die Qualität ihres Samens eine bedeutende Wirkung aus. Von der Fortpflanzungsbiologischen Abteilung des Forschungsinstituts für Tierzucht durchgeführte Untersuchungen (PÁSZTOR) haben ergeben, daß die Libido der empfindlicheren männlichen Tiere anlässlich der Wetterfrontveränderungen schwächer wird. Das Ejakulat enthält viele unbewegliche Spermien. Die Qualitätsverschlechterung des Samens ist unmittelbar vor dem Erscheinen der Frontsymptome oder während der Frontveränderung zu beobachten und hält nur kurze Zeit an. Einige Wetterfaktoren, z. B. der relative Feuchtigkeitsgehalt der Luft, die Temperatur, die Intensität der Sonnenstrahlung, üben gleichfalls Einfluß auf die Spermaproduktion aus. Bei Arten, bei welchen die Domestikation verhältnismäßig spät eingetreten ist, kommt den Wetterfaktoren, besonders der Sonnenstrahlungsintensität, im Auftreten der Libido und in der Qualität des Samens große Bedeutung zu.

Im Gegensatz zum dauernden Stallaufenthalt ist die ausgiebige Haltung der Tiere im Freien für die Spermaerzeugung vorteilhaft. Wo sich die Bullen den ganzen Tag im Freien aufhalten, kommen Fehler in der Samenproduktion seltener vor. Wo jedoch diese Frage noch nicht gelöst ist (Kecskeném, Mezőhegyes), dort wird oft über die Qualität des Spermias und die Libido der Bullen geklagt.

Durch die quantitativ und qualitativ gut organisierte systematische Arbeit — statt der dauernden Ruhe — wird die Libido, die Vitalität der Spermien und letzten Endes die Fertilität günstig beeinflusst. Wenn man jedoch

einen alten Hengst oder schwer gewordenen Bullen, um sie auslaufen zu lassen, zu ermüdenden Wegen zwingt, wenn man die männlichen Zuchttiere bei feuchtem, windigem Wetter stundenlang im Freien hält, so wird ihre Libido schwächer und auch die Qualität des Samens schlechter.

Von subklinischen Erkrankungen, insbesondere von Verdauungsstörungen dieser Art, werden Quantität und Qualität des Samens erheblich beeinträchtigt. Die im inneren Milieu ständig erzeugten pathologischen Stoffwechselprodukte werden resorbiert und beeinflussen vor allem die Funktion der akzessorischen Geschlechtsdrüsen ungünstig. Diese Veränderungen lassen sich schwer eliminieren, weil sie ihrer Natur gemäß schwierig zu erkennen sind und leicht der Aufmerksamkeit des Fachmanns entgehen. Es empfiehlt sich daher, insbesondere wenn Futtermittel von schwächerer Qualität zur Verwendung kommen, gleichsam zur Prävention die verdauungsfördernden Futtervorbereitungsmethoden einzuführen, beispielsweise die Hefebehandlung des Kraftfutters, die Verfütterung von Antibiotika.

Im Rahmen eines früheren Versuchs haben wir in verschiedenen Stationen für künstliche Befruchtung 45 Bullen und 80 Hengste untersucht, in deren Spermaproduktion wir mehr oder weniger Anomalien fanden. Sechs Wochen hindurch wurde ihrem Kraftfutter Hefe zugegeben, worauf ihre Libido stärker wurde und auch die Samenmenge zunahm. Das Sperma war dichter, die Bewegung der Spermien ist lebhafter geworden. Die biologische Untersuchung des Samens ergab gleichfalls bessere Werte. Die Qualitätsverbesserung des Spermas war bei denjenigen männlichen Tieren nicht zu beobachten, bei denen Mängel an anatomischen Aufbau der Samenzellen vorlagen.

Die Fertilität der Vattertiere wird auch von exogenen Faktoren beeinflusst, die nur kurze Zeit einwirken. Ein unter schlechten Bedingungen durchgeführter Tiertransport führt, auch wenn er nur einige Stunden dauert, aber das Tier erschöpft, zur einwandfrei feststellbaren Verschlechterung der Samenqualität.

Manche männliche Tiere reagieren auch auf die Bedingungen der Samenentnahme stärker als die anderen. Eine Qualitätsverschlechterung des Samens kann auch dann eintreten, wenn die Paarung nicht in der gewohnten Umgebung erfolgt. Aus diesem Grunde organisieren wir die Bedingungen der Samenentnahme in der Praxis der künstlichen Insemination durch Sicherung derselben Verhältnisse, um nach Möglichkeit zu verhindern, daß bei den Tieren schädliche Reflexwirkungen zustande kommen.

Den die Samenqualität verschlechternden Effekt der unzumutbaren Tierhaltung und der anscheinend entsprechenden, in Wirklichkeit jedoch ermüdenden Arbeit haben wir unlängst beobachten können. Aus betriebstechnischen Gründen hatte man geteilte Arbeitszeit für die Tierpfleger eingeführt, so daß die Tiere vor der morgens 8 Uhr beginnenden Samenentnahme bereits ruhen konnten. Mit der Fütterung und Pflege der Bullen wurde morgens um 1/23 Uhr begonnen, statt um 6 Uhr, wie früher. Das an sich übliche Auf- und Abführen wurde bei mehreren Tieren durch mehrstündige Ackerbestellung bzw. durch kleinere oder größere Fuhrarbeiten ergänzt. Nach 5—6 Monaten traten anfangs vereinzelt, später immer häufiger Spermaproduktionsstörungen auf. Die Bullen waren zwar stiller, aber deckten zufriedenstellend. In dem unmittelbar nach der Ejakulation untersuchten Samen war die Massenbewegung der Spermien lebhaft, doch tolerierten sie nicht die Samenverdünnung. Bereits unter der Wirkung von wenigen Tropfen Verdünnungslösung stellten

die Spermien anfangs erst nach einigen Stunden, später innerhalb von wenigen Minuten, ja sogar nach einigen Sekunden die Bewegungen ein. Aus den biologischen Färbungen mußte auf den anabiotischen Zustand der Spermien geschlossen werden. Mit Eosin-Nigrosin färbte sich der Kopf der Spermien nur halb und blaßrosa. Zur Samenverdünnung benutzten wir die Salisburysche Eigelb-Zitrat-Glukoselösung. Fallweise wurde mit entrahmter Kuhmilch verdünnt. Die übliche, aus doppeldestilliertem Wasser zubereitete Verdünnungslösung war schädlicher als die aus Brunnenwasser hergestellte. Im morphologischen Aufbau der Spermien fanden wir keine Veränderung.

Die Qualitätsverschlechterung des Spermas darf auf eine vorübergehende Störung (Erschöpfung) des vegetativen Nervensystems der Bullen zurückgeführt werden. Die Bullen hatten sich an die neue Situation, die wesentliche Verkürzung ihrer Ruhezeit, nicht gewöhnt. Infolge der veränderten Funktion ihres vegetativen Nervensystems hatte sich auch die Zusammensetzung des Samenplasmas geändert. Angesichts ihrer herabgesetzten Widerstandsfähigkeit tolerierten die Spermien die mit der Verdünnung einhergehende Belastung nicht.

Obzwar die Bullen viel lagen, vermochten sie sich in Wirklichkeit doch nicht auszuruhen, weil sie durch die Bewegung am frühen Morgen und die Inanspruchnahme am Tage ermüdet wurden. Als wir wieder die frühere Tagesordnung einführten, d. h. die Pflege und Fütterung morgens um 6 Uhr begannen und ihre Verwendung als Zugtiere aufhörte, besserte sich allmählich die Qualität des Spermas, und nach einigen Wochen war der Samen wieder einwandfrei.

Der Fall ist deshalb beachtenswert, weil die Ursache der Qualitätsverschlechterung des Samens infolge der langsamen Entwicklung nur schwer geklärt werden konnte und eine Störung in der Samenproduktion eingetreten war, welche die Arbeit der Hauptstation fast ganz lahmlegte.

Das vegetative Nervensystem bildet ein Kettenglied zwischen dem obersten Abschnitt des Zentralnervensystems und den inneren Organen (HETÉNYI). Bei der Bewertung der Geschlechtstätigkeit und Spermaproduktion der männlichen Tiere müssen diese anatomischen und funktionellen Zusammenhänge berücksichtigt werden. Die Geschlechtstätigkeit wird durch die zum vegetativen Nervensystem gehörigen unbedingten Reflexe gewährleistet. Auf ihre Qualität üben die bedingten Reflexe starken Einfluß aus. Dieser Einfluß ist je nach den exogenen Einwirkungen günstig oder ungünstig.

Die Qualität des Spermas ist in hohem Maße vom Samenplasma abhängig. In welchem Ausmaß die kinetische und vitale Energie der Spermien freigesetzt wird, beruht größtenteils auf der Qualität des Sekrets der akzessorischen Geschlechtsdrüsen. Die Einwirkungen der Umwelt auf den Organismus rufen über die Reflexbahnen Erregungen hervor und lösen Veränderungen in der Tätigkeit der akzessorischen Geschlechtsdrüsen aus.

Die Qualitätsveränderungen des Spermaplasmas können auch durch die Veränderungen im Gehalt an freien Aminosäuren nachgewiesen werden. Sperma von schlechter Qualität hat einen anderen freien Aminosäuregehalt als qualitativ einwandfreies. Die Qualitätsveränderung des Samens steht im geraden Verhältnis zu den biochemischen Veränderungen im Spermaplasma.

BELEBUNGSVERSUCHE MIT KONDOMSPERMA

R. BUDVÁRI

INSTITUT FÜR GERICHTLICHE MEDIZIN, MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT, BUDAPEST*

Zusammenfassung

Ein eigenartiges Problem der zu gerichtlichen Zwecken (Ehescheidungsprozessen, Vaterschaftsklagen usw.) durchgeführten Spermauntersuchungen ist der Fall des ins Kondom entleerten Spermas. Die vorliegenden Versuche unterstützen die mehr oder minder bekannte Tatsache, daß das sog. Kondomsperma für jede Art von spermatologischen Untersuchungen ungeeignet ist. Wie die Versuche beweisen, bringen die dem Talkpulver beigemengten spermiziden Stoffe, die die Verklebung des Kondoms verhindern sollen, die Bewegung der ins Kondom gelangten Spermien innerhalb von 1—2 Minuten zum Stillstand. Dieser spermizide Effekt ist irreversibel, und trotz Zugabe von bekannten Belebungslösungen kehrt die Motilität der unbeweglichen Spermien nicht zurück, und der spermizide Effekt läßt sich auch durch im voraus ins Kondom gespülte Lösungen nicht abwehren.

In der Praxis hat die Spermatologie im wesentlichen zwei Hauptaufgaben: die Infertilitätsuntersuchungen bei den sich nach Kindern sehrenden Ehepaaren und die Untersuchungen des Zeugungsvermögens zu gerichtlichen Zwecken (in Ehescheidungsprozessen, hauptsächlich aber bei Vaterschaftsklagen). Die theoretischen Fragen der Spermatologie dienen — von Veterinärproblemen abgesehen — diesen beiden wichtigsten Zwecken.

Die *forensische Spermatologie* wirft naturgemäß eigenartige Probleme auf, denen in diesem Rahmen besondere Bedeutung zukommt. Zu diesen rechnet das ins Kondom entleerte Sperma, in dem eine eigentümliche Motilitätsstörung der Spermien eintritt. Die Spermatologie begnügt sich im allgemeinen mit der theoretischen Feststellung, das Kondomsperma sei für Infertilitätsuntersuchungen völlig ungeeignet und komme daher für diesen Zweck nicht in Frage. Aus diesem Grunde führten wir unter Berücksichtigung der speziellen Gesichtspunkte der forensischen Spermatologie Versuche zur Klarstellung folgender Fragen durch:

1. Worauf beruht es, daß die in das Kondom gelangten Spermien unbeweglich werden?
2. Handelt es sich bei dieser spermiziden Wirkung um eine temporäre oder definitive, und ist der Effekt reversibel?
3. Nach welcher Zeitspanne tritt die spermizide Wirkung in Erscheinung?
4. Läßt sich die spermizide Wirkung des Kondoms verhindern?
5. Auf welche Weise kann die vom Kondom hervorgerufene »Nekrospermie« festgestellt werden?

Bei den Versuchen benutzten wir das bei den für gerichtliche Zwecke vorgenommenen Zeugungsfähigkeitsuntersuchungen gewonnene Sperma. In

* Zur Zeit: Pécs

Einzelfällen wurde die Untersuchung wiederholt und das beim zweitenmal entleerte Sperma in ein Kondom aufgefangen oder aber — häufiger — das in eine Flasche entleerte Ejakulat halbiert und die Hälfte nach Überführung in ein Kondom untersucht. Dem Kondomsperma entnahmen wir Proben zu verschiedenen Zeitpunkten, und zwar *sogleich* nach der Ejakulation (oder Einfüllung in das Kondom), nach 15 Minuten, 60 Minuten und nach 12 Stunden. Je einen Tropfen der Proben untersuchten wir nach Verdünnung mit verschiedenen Belebungslösungen im Verhältnis 1 : 10 mikroskopisch, wobei das Aufhören oder Lebhafterwerden der Spermienbewegungen 10—15 Minuten hindurch beobachtet wurde; ferner führten wir auch andere Versuche durch. (Verwendet wurden Kondome ungarischer Erzeugung, Fabrikat *Emergé de Luxe*, Exportqualität.)

Die auffallendste Eigentümlichkeit des Kondomspermas ist die völlige Unbeweglichkeit der Spermien. Worauf beruht diese Erscheinung? Anfangs empfahl man das Kondom als Schutzmittel gegen Geschlechtskrankheiten; nachdem jedoch ständig dünnerer Gummi verwendet wurde und die häufigeren Risse im Kondom zu unangenehmen Folgen führten, wurden den Kondomen von den Fabriken spermizide Stoffe zugegeben. Diese benzenartigen spermiziden Substanzen besitzen eine starke Wirkung und werden in der Regel dem Talkpulver beigemischt, welches die Verklebung des Kondoms verhindern soll. Wird das Kondom gründlich mit physiologischer Kochsalzlösung ausgespült, so verliert sein Inneres endgültig die spermizide Wirkung. Zugleich zeigt die Spülflüssigkeit, selbst noch in 10facher Verdünnung, aktiven spermiziden Effekt.

Für die spermizide Wirkung gibt es zwei Maßstäbe: erstens den Zeitpunkt des Auftretens der spermiziden Wirkung, zweitens die Irreversibilität des Effektes. Unsere Versuche erstreckten sich hauptsächlich auf den ersteren Fall.

Wie bereits erwähnt wurde, entnahmen wir Spermaproben zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Entleerung bzw. Einfüllung des Spermas in das Kondom. Da die Literaturangaben im allgemeinen von einer *langsamen* spermiziden Wirkung sprechen, entnahmen wir anfangs die erste Probe nach 12stündiger Aufbewahrung des Ejakulates im Kondom. Nach dieser Zeitspanne trat die spermizide Wirkung im Ejakulat bereits total zutage, bewegliche Spermien waren nicht mehr zu entdecken. Dasselbe stellten wir auch in den Kondomspermaproben fest, die zu früheren Zeitpunkten, 1—2 Stunden nach der Ejakulation, entnommen worden waren. Aber selbst in den nach 15 Minuten dem Kondom entnommenen Spermaproben waren die Spermien ausnahmslos unbeweglich. Schließlich entnahmen wir Spermaproben 1—2 Minuten nach dem Eintritt in das Kondom, aber auch in diesen Fällen war der spermizide Effekt vollständig.

So konstatierten wir, daß die im Kondom enthaltene spermizide Substanz — zumindest in dem unserseits untersuchten Fabrikat — prompt gewirkt hat (diese Feststellung gilt aber wahrscheinlich auch für andere Kondome). Die Wirksamkeit des spermiziden Stoffes prüften wir auch, indem wir noch unbenutzte Kondome mit 20 ml physiologischer Kochsalzlösung ausspülten und einen Tropfen der Spülflüssigkeit mit einem frischen Samentropfen zusammenbrachten. Im Mikroskop war zu sehen, wie die Motilität der Spermien allmählich nachließ, die nach 3—4 Minuten nur noch terminale Zuckungen ausführten; binnen 5—6 Minuten hatte jede Bewegung aufgehört.

Nach unseren experimentellen Ergebnissen kommt die spermizide Wirkung demnach innerhalb weniger Minuten zur Geltung. Es ergibt sich nun die Frage, ob dieser Effekt nicht vorübergehender Natur, d. h. reversibel ist. Diesem Umstand kommt deshalb Bedeutung zu, weil das Kondomsperma im Falle einer reversiblen Wirkung einerseits für die Untersuchung noch verwendet werden könnte und andererseits die Reversibilität die Differenzierung der echten von den Pseudonekrospermien erleichtern würde. Deshalb nahmen wir Belebungsversuche mit den zu verschiedenen Zeitpunkten dem Kondom entnommenen Spermaproben vor.

Zu diesem Zweck benutzten wir die folgenden, in der spermatologischen Literatur als am wirksamsten empfohlenen Belebungslösungen:

Baker-Lösung (Gemisch von Natrium und Kaliumphosphat sowie Glukose),

Joël-Lösung (Dextrose und $MgCl_2$),
isotonische Ammoniumhydroxyd-Lösung,

Locke-Lösung,

Hirokawa-Flüssigkeit (modifizierte Locke-Lösung).

Die Belebungslösungen vermengten wir im Wassermannschen Röhrchen mit dem Sperma, und zwar gaben wir 10 Tropfen Flüssigkeit zu 1 Tropfen Kondomsperma. Hiervon trüffelten wir einen Tropfen auf den Objektträger, legten ein Deckglas darauf und beobachteten, wann die Motilität der unbeweglichen Spermien zurückkehrt. Dies trat in keinem einzigen Fall ein. Dieses Ergebnis beweist unbedingt die Irreversibilität der spermiziden Kondomwirkung.

In diesem Zusammenhang untersuchten wir noch ein weiteres Problem: Inwieweit kann die spermizide Wirkung durch Zugabe von Belebungslösungen zum Sperma abgewehrt bzw. hinausgezögert werden? Einem Tropfen frischen Spermas setzten wir einen Tropfen Kondospülflüssigkeit zu und trüffelten zu diesem Gemisch 8 Tropfen von der am wirksamsten befundenen Joël-Lösung. Wie schon erwähnt, wurden die Spermien von einem Tropfen Spülflüssigkeit innerhalb von 5—6 Minuten unbeweglich. Durch die Zugabe der Joël-Lösung wurde diese Wirkungsdauer um 15—20 Minuten hinausgezögert, indessen kam es ungeachtet der Anwesenheit der Joël-Lösung zu einer stetigen Verlangsamung der Spermienmotilität, und schließlich kam die Bewegung unter krampfhaften Zuckungen zum Stillstand. Infolgedessen nehmen wir an, daß es sich nicht um einen spezifischen Effekt der Joël-Lösung handelte, vielmehr einfach darum, daß sie die Konzentration der spermiziden Substanz verminderte und ihre Wirkung auf diese Weise hinauszögerte. Es gelang somit nicht, die spermizide Wirkung auf diese Weise abzuwehren.

Für das Kondomsperma ist demnach die totale, auf Belebungsversuche nicht reagierende Unbeweglichkeit charakteristisch. Im Gegensatz zu den auf Belebungsversuche positiv reagierenden Pseudonekrospermien bedeutet dies eine echte Nekrospermie. In Ungarn hat MOLNÁR sehr nachdrücklich auf die Tatsache hingewiesen, daß echte, *genuine* Nekrospermie außerordentlich selten vorkommt und unter 2000 Fällen lediglich einmal beobachtet wurde. Der Gerichtssachverständige stellt dennoch wiederholt Nekrospermie fest, die — man kann ruhig behaupten — fast ausnahmslos zu Täuschungszwecken hervorgerufen worden ist. Die Hauptquelle derartiger Täuschungen ist das Kondomsperma. Es ist daher wichtig zu wissen, worauf die Unbeweglichkeit der Samenfäden in dem zur Untersuchung übergebenen Sperma beruht. Wenn diese — wie meistens — aus der im Kondom enthaltenen spermiziden Substanz

resultiert, so läßt sich für den Nachweis die Tatsache verwerten, daß der spermizide Kondomstoff bereits in sehr geringer Menge außerordentlich starke Wirkung ausübt. Darauf fußt die geistreiche und einfache Molnársche Probe:

Das verdächtige Sperma, das unbewegliche Samenfäden enthält, wird mit einem Tropfen frischen Spermas vermischt, in dem sich die Samenfäden gut bewegen. Stammt der verdächtige Samen aus einem Kondom, so wird die Motilität der Spermien von dem einen Spermotropfen, wie die Versuche ergaben, innerhalb von 15 Minuten unbedingt zum Stillstand gebracht. In diesem Fall sieht man nur noch vereinzelte zuckende Samenfäden. Auf diese Weise vermag man die spermizide Wirkung sehr einfach zur Aufdeckung des mit dem Kondomsperma geplanten Betruges zu verwerten.

Unsere Untersuchungen bestätigten mithin auch objektiv, daß sich das in ein Kondom entleerte Sperma für keinerlei Untersuchungen eignet, weil das Innere der Kondome eine spermizide Substanz enthält, welche die Motilität der Samenfäden innerhalb von 1—2 Minuten zum Stillstand bringt und deren Wirkung irreversibel ist, so daß die Spermien mit keiner Lösung wieder belebt werden können. Fernerhin läßt sich der spermizide Effekt durch Zugabe von Belebungslösungen zum Sperma nicht abwehren.

LITERATUR

1. VASTERLING, H. W. (1960), *Praktische Spermatologie*. Thieme, Stuttgart.
2. JOËL, C. A. (1953), *Studien am menschlichen Sperma*. 2. Aufl., Schwabe, Basel.
3. SCHELLEN, A. (1957), *Artificial insemination in the human*. Elsevier, London.
4. MOLNÁR, J. (1960), *Orv. Hetil.*, **9**.

IMPORTANCE CLINIQUE DE L'ÉTUDE MORPHOLOGIQUE DU SPERME EN RELATION AVEC LE MÉTABOLISME DU FRUCTOSE

S. M. MILCOU, M. MAICANESCO et H. DINULESCO

INSTITUT D'ENDOCRINOLOGIE «PROF. C. I. PARHON», BUCAREST

Résumé

De nombreuses réalisations dans le domaine de la biochimie séminale ont considérablement accru la valeur de l'examen du sperme et ont conduit à de nouvelles interprétations.

Les recherches des auteurs ont porté sur l'étude morphologique du sperme et sur l'estimation du fructose et de la fructolyse. On a étudié la valeur clinique des renseignements fournis par les critères morphologiques et les composés chimiques du sperme.

Quelques aspects ont particulièrement retenu l'attention, à savoir:

— l'atteinte portant surtout sur la spermatogenèse, au caractère dégénératif, dans les affections nerveuses;

— les perturbations morphologiques et chimiques dans les maladies endocriniennes et

— les troubles profonds des processus biochimiques en pathologie enzymatique.

Ces faits démontrent la mesure dont les troubles de ces trois importants mécanismes se reflètent dans la pathologie séminale.

Il en résulte qu'actuellement l'analyse du sperme ne peut être limitée à la seule appréciation du processus de la reproduction, car, grâce à l'essor de la biochimie et de la microscopie électronique, son utilité en clinique est devenue de beaucoup plus large.

L'analyse du sperme pourrait ainsi constituer un moyen pratique de conduite du traitement testostéronique et d'appréciation sur l'évolution d'une maladie. En même temps, elle pourrait aider les cliniciens à interpréter la pathogénie — non élucidée — de certains syndromes.

Introduction

Les variations quantitatives et qualitatives des constituants du sperme posent des problèmes de pathogénie et de pathophysiologie, qui dépassent le cadre des insuffisances testiculaires proprement dites.

Longtemps, les recherches ont porté surtout sur les phénomènes ayant trait aux processus de reproduction.

Ce n'est que dernièrement que l'examen du sperme a acquis une application plus large dans la clinique, s'imposant comme analyse courante dans la pratique médicale.

La qualité du sperme étant conditionnée par les facteurs physiologiques, l'appréciation de leur intervention dans la genèse séminale et dans les processus métaboliques, constitue la préoccupation actuelle des chercheurs travaillant dans ce domaine.

Divers auteurs ont signalé les valeurs isolées — même divergeantes — des constituants cytologiques et chimiques du sperme, qui — loin de mini-

miser l'importance et l'exactitude des méthodes de recherche — suggèrent l'indépendance des processus et la complexité des facteurs y intervenant.

La pathologie séminale accompagne d'habitude un syndrome morbide qui peut englober le système endocrine.

C'est pourquoi les recherches doivent être dirigées premièrement vers le dérèglement des mécanismes physiologiques déterminant la composition du sperme. C'est d'ailleurs le but de notre exposé.

Nous essayerons, donc, d'interpréter — dans les névroses — endocrinopathies et diverses autres affections — de manière pathogénique, la cytopathologie du sperme, le fructose et son métabolisme.

La physiologie de la spermatogenèse implique des mécanismes de règlement dont la fonction n'est que partiellement connue.

Parmi les facteurs *endocriniens*, le FSH représente le stimulus principal, son rôle dans l'induction de la spermatogenèse ayant été démontré par voies cliniques et expérimentales. L'ICSH et les androgènes testiculaires interviennent de manière secondaire dans le maintien de la spermatogenèse. Quant aux autres glandes endocriniennes, leur rôle est moins prouvé cliniquement; il paraît que la thyroïde et la surrénale l'influencent aussi.

Le déficit des hormones antéhypophysaires pourrait agir de manière défavorable sur la lignée séminale par: a) troubles métaboliques associés; b) atteinte des hormones gonadotropes; c) perturbation concomitante des centres nerveux au rôle trophique à la périphérie.

Dernièrement, à part le facteur endocrinien, un autre facteur — d'importance égale dans la spermatogenèse — vient de se profiler: le *facteur nerveux*. Le système nerveux central — par l'hypothalamus — est intéressé dans la réglementation des décharges de la FSH et de l'ICSH, mais il peut aussi contrôler directement la fonction testiculaire par des structures nerveuses hypothalamiques ou par celles situées à d'autres niveaux. Maintes observations ont signalé des atrophies testiculaires et altérations germinatives dans les lésions du système nerveux central et des voies sous-jacentes.

Par ses travaux expérimentaux, SOULAIRAC [6], confirmés par les observations cliniques de NOWAKOWSKY [4] et d'autres auteurs, met les bases de la pathologie germinale de nature nerveuse. Ils attirent l'attention — tant cliniquement qu'expérimentalement — sur le fait que certaines lésions nerveuses déterminent la destruction presque exclusive — de la lignée germinative, et — de manière inconstante — du tissu leydigien.

D'ailleurs, les terminaisons neurofibrillaires — d'origine sympathique — au niveau de l'épithélium germinatif, décrites par PETERS et autres ainsi que la présence des médiateurs chimiques du type de l'adrénaline dans le plasma, sont une preuve de plus de la relation des tubes séminifères avec le système nerveux.

STEEVE [7] illustre l'importance du facteur nerveux, en signalant la dégénérescence de l'épithélium germinatif et sa disparition même, sous l'influence des facteurs psychiques, aspects observés par nous aussi, par suite des lésions nerveuses centrales [5], chocs psychiques [3], traumatisme génital [2]. Le mécanisme d'action du système nerveux à ce niveau n'est pas élucidé; il pourrait influencer l'activité de certains systèmes enzymatiques locaux. Sa résolution constituerait une étape importante dans l'étude du sperme.

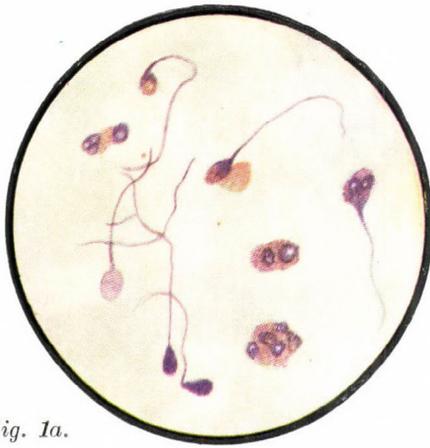


Fig. 1a.

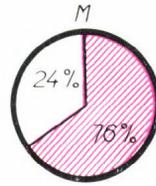
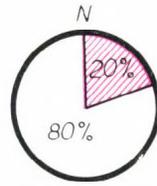


Fig. 1b.



Fig. 2.



Fig. 3.

Fig. 1a. Anomalies des spermatozoïdes et des cellules germinales dans le myxoedème de l'adulte

Fig. 1b. Pourcentage des spermatozoïdes normaux chez l'adulte normal (N) et chez le myxoedemateux (M). Rouge: spermatozoïdes atypiques. Blanc: spermatozoïdes normaux

Fig. 2. Spermatozoïdes atypiques dans les névroses

Fig. 3. Morphologie des spermatozoïdes dans le crétinisme endémique

La motilité du spermatozoïde dépend non seulement de ses qualités structurales, mais aussi de la nature du substratum fourni par le plasma.

Vu qu'à la dynamique du spermatozoïde prennent part des facteurs multiples, la motilité ne suit pas toujours de façon rigoureuse les variations de la concentration et de la morphologie des spermatozoïdes.

Le fructose séminal est considéré comme la source importante d'énergie pour la cellule germinative. Sa détermination est actuellement la méthode la plus utilisée dans l'appréciation de la fonction incrétoire testiculaire. En éliminant les facteurs accidentaux qui pourraient masquer la fonction androgène testiculaire tels que: facteurs infectieux, processus obstructifs, maladies métaboliques du type du diabète sucré (fig. 8) etc., le fructose exprime aussi l'état fonctionnel des systèmes enzymatiques qui participent à la conversion du glucose.

La dégradation du fructose — fructolyse — avec la production d'acides lactique et pyruvique, entraîne d'autres phénomènes chimiques indépendants du niveau initial du fructose.

Tout comme la motilité, la fructolyse est le résultat de l'activité métabolique de la cellule spermatique [1] et du potentiel enzymatique du plasma. Motilité et fructolyse bénéficient d'interprétation commune, mais elles ne se superposent pas.

Il est évident que la cytologie du sperme et sa composition chimique subissent l'influence des actions isolées ou combinées. La contribution de chaque facteur à part est à résoudre.

Dans ce qui suit, nous allons discuter certaines variantes que le tableau morphologique et chimique pourrait présenter, telles que: l'atteinte presque exclusive de la spermatogenèse ou bien l'affectation prédominante des phénomènes chimiques du plasma (fructose et fructolyse).

Ces particularités, concernant les rapports entre les constituents du sperme, corrélatives au tableau clinique général, pourraient jeter un jour nouveau sur l'interprétation de l'analyse microscopique et chimique du sperme. L'étude systématique de ces relations dans des anomalies cytologiques, allant jusqu'à la disparition complète de la lignée germinative, pourrait nous donner certaines indications précieuses à ce sujet.

Troubles portant sur la spermatogenèse

Chez un adulte au myxoedème central sévère, l'inversion de la formule cytologique, avec presque la disparition des éléments normaux et la fréquence impressionnante des cellules bi- et multinucléaires (fig. 1) a constitué le trait principal. Les traitements hormonaux institués (testostérone, prolan, cortisone, thybon) n'ont eu aucun effet.

Il est à retenir qu'au tableau cytopathologique sévère correspondait une hypoandrogénie légère, la diminution des caractères sexuels secondaires étant de moindre importance et le fructose toujours dans les limites du normal (282 mg %, 320 mg %). L'étiologie du processus morbide ne paraît pas uniquement endocrinienne. L'insuffisance thyroïdienne sévère entraîne des déficits métaboliques et enzymatiques auxquels — probablement — s'ajoute le dérèglement des centres nerveux au rôle dans le maintien de la trophicité glandulaire. L'absence de réponse au traitement hormonal institué prouve l'étiologie complexe du cas.

Dans les azoospermies sécrétoires du type d'aplasies germinatives congénitales (syndrome Del Castillo) ou acquises (chocs psychiques, traumatisme génital) chez les individus bien sexualisés — ou presque — la diminution du fructose n'a pas été remarquée (fig. 4); par contre, la valeur du fructose marquait jusqu'à 700 mg% par cmc de liquide séminal, preuve de l'affectation de l'épithélium germinatif et de la non-atteinte du tissu leydigien par le processus morbide.

Dans ces cas, les processus chimiques, intervenant dans la fructolyse, ne sauront être correctement appréciés par faute de cellules séminales. Nous avons constaté les mêmes modifications — quoique moins importantes — entre

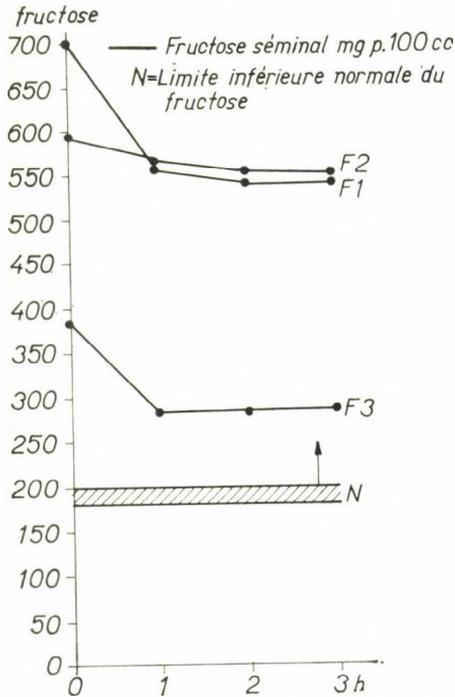


Fig. 4. Valeurs normales ou augmentées du fructose séminal dans les aplasies germinales

les composants cytologiques et les phénomènes chimiques du plasma, dans les névroses.

C'est ainsi que dans certaines formes chroniques rebelles aux traitements habituels, l'examen microscopique a montré — à part l'oligoasthénospermie préexistente — l'augmentation de 20 à 40% des formes anormales du type dégénératif, aux vacuolisations multiples, hyperchromatophilie, anisospermie accentuée (fig. 2).

Nous avons décrits les mêmes aspects dans les formes aiguës de névrose, accompagnées ou non de troubles de la dynamique sexuelle.

Dans tous ces cas, la concentration du fructose a été normale (fig. 5). La fructolyse, la motilité et la viabilité des spermatozoïdes ont été réduites

dans la plupart des cas, ce qui prouve la perturbation des phénomènes chimiques intervenant dans la dégradation du fructose.

La formule cytochimique a été également intéressante dans le cas où l'examen clinique plaiderait pour hypoandrogénie (syndrome adipsogénital, atrophie testiculaire, après intervention sur le cordon). L'oligoasthénospermie — dans un des cas —, les anomalies morphologiques des spermatozoïdes — dans un autre cas — prouvaient aussi l'insuffisance testiculaire. Pourtant, la détermination du fructose n'a pas confirmé le diagnostic d'hypoandrogénie (fig. 6).

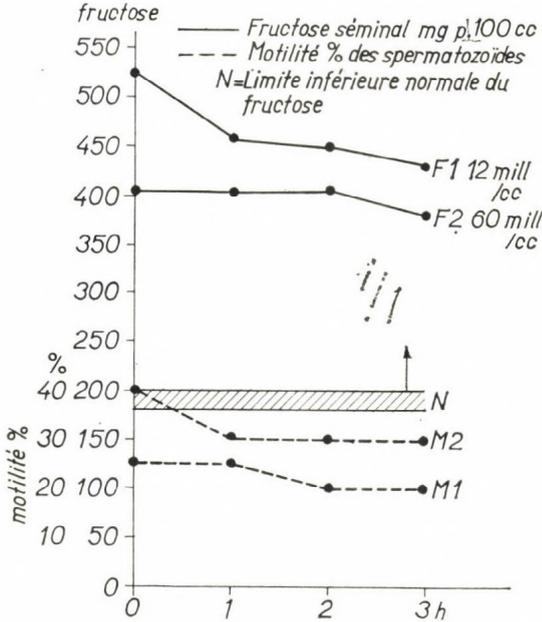


Fig. 5. Fructose et fructolyse dans deux cas de névrose

Ces données ne manquent pas de signification: le tissu leydigien — même réduit — ne provoque pas de modifications dans la chimie du sperme et peut maintenir même les caractères sexuels — une fois installés, bien entendu jusqu'à une certaine limite.

Le niveau réduit du fructose serait donc l'expression de l'atteinte plus sévère du testicule endocrinien.

Troubles portant sur les processus biochimiques du sperme

Quelquefois, le rapport entre les constituants du sperme pourrait être inversé en la défaveur des processus métaboliques. De légères altérations de la concentration et de la morphologie des spermatozoïdes peuvent être accompagnées de sévères troubles métaboliques.

Dans les cas du crétinisme endémique, à sexualisation normale et fertilité — la morphologie des spermatozoïdes étant presque normale (fig. 3), seuls les troubles de la motilité — et parfois le déficit d'homogénéisation — pourraient aviser d'un dérèglement métabolique important. Les valeurs extrêmement basses et la quasi absence de la fructolyse (fig. 7) ont conduit à l'hypothèse du blocage de la conversion du glucose en fructose, faute de déficit ou de l'absence congénitale des enzymes qui y sont impliqués (succin-déhydrogénase, aldolase).

L'étude des étapes intermédiaires du métabolisme hydrocarbonique — là où une affection d'origine congénitale est à supposer — préciserait non

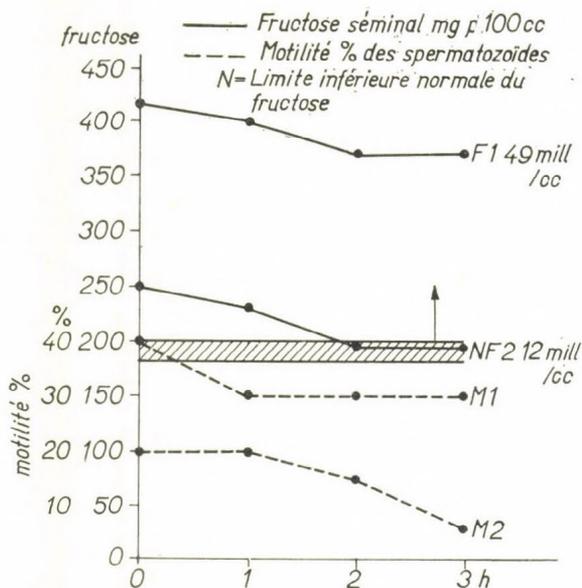


Fig. 6. Valeur normale du fructose dans deux cas d'atrophie testiculaire

seulement la pathogénie de l'insuffisance testiculaire, mais aussi celle de l'affection même. Dans ces cas, le manque de réponse du fructose à l'administration de la testostérone est une preuve de plus de l'étiologie non-endocrinienne (androgénique ou bien du type insuffisance d'ICSH) du processus pathologique.

L'existence des troubles d'origine congénitale du métabolisme du fructose, tels que: la fructosurie essentielle par l'absence de kétokynase, l'intolérance héréditaire du fructose par la diminution de 1-P-fructaldolase, prouvent son indépendance métabolique, par rapport aux autres hydrocarbonés, ce qui renforce notre hypothèse selon laquelle — dans le crétinisme endémique et d'autres cas cliniques — il existerait un déficit congénital des systèmes enzymatiques du sperme.

Discussion

La large utilisation de l'analyse séminale démontre que seul l'examen cytologique n'est pas suffisant à estimer la fonction testiculaire. Il est erroné de croire qu'à une spermatogénèse normale, ou presque — correspondrait une activité leydigienne d'importance égale.

Notre pratique a démontré que:

— les fonctions tubulaire et hormonale ne vont pas toujours de paire. C'est pourquoi l'appréciation de l'activité exo- et endocrinienne du testicule impose l'exploration la plus complète du liquide séminal, soit autant l'analyse microscopique que l'étude des étapes chimiques intermédiaires;

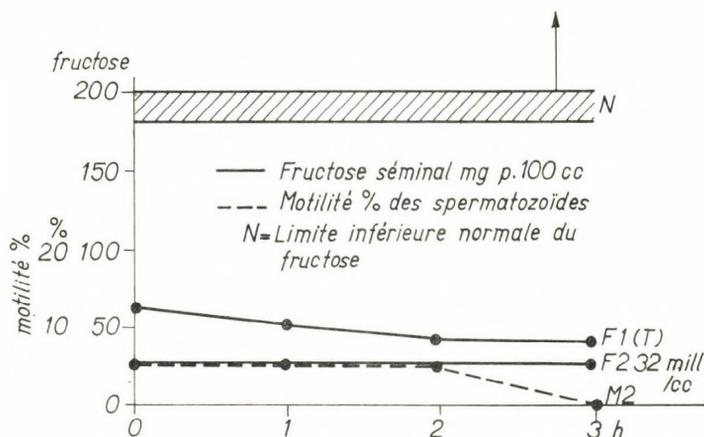


Fig. 7. Valeurs très basses du fructose, absence de la fructolyse et manque de réponse au traitement à la testostérone (F₁T) dans le crétinisme endémique

— dans les endocrinopathies les deux fonctions du testicule sont variablement intéressées, à de degrés différents, selon la gravité du processus pathologique;

— l'étiologie unique endocrinienne des troubles de la spermatogénèse est assez rare, par rapport à la fréquence des facteurs actionnant à ce niveau. Parmi ces derniers, c'est au facteur nerveux que revient un rôle des plus importants, auquel s'associent d'autres facteurs capables de générer les troubles métaboliques et enzymatiques du sperme;

— le dérèglement nerveux (névrose, choc psychique etc.) se reflète spécialement sur la spermatogénèse, sur la motilité et — il paraît — aussi sur les mécanismes impliqués dans la fructolyse. C'est pourquoi le tableau pathologique séminal pourrait indiquer dans les névroses la gravité de l'affection, son évolution et éventuellement la réversibilité du processus pathologique, problème que nous avons actuellement en étude;

— dans l'affectation des processus chimiques du plasma on pourrait incriminer le manque de l'ICSH ou l'insuffisance androgénique testiculaire, mais ces mêmes aspects pourraient signifier la perturbation des systèmes enzymatiques de nature congénitale ou acquise;

— le retour au normal du fructose initialement abaissé — après administration de la testostérone — prouve l'apport diminué des androgènes testiculaires; au cas contraire, il est à supposer que le déficit est situé à un autre niveau, parce que le développement des processus chimiques est bloqué. Dans ces cas, la substitution du plasma pathologique par le plasma normal ou bien par le plasma sanguin — dont la composition est assez ressemblante —

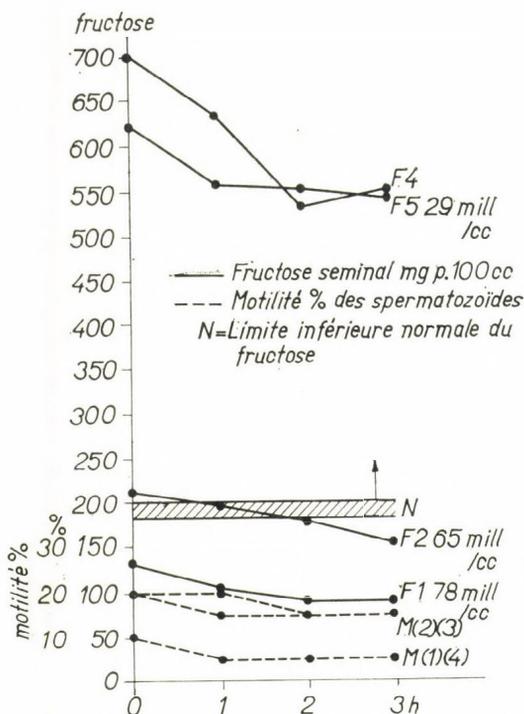


Fig. 8. Fructose et fructolyse dans le diabète sucré. Taux normaux du fructose (1 cas) ou augmentés (2 cas)

préciserait la provenance plasmatique ou cytologique de ces anomalies. La connaissance de ces phénomènes contribuerait à la résolution — au moins partielle — de l'étiopathogénie des nécrozoospermies, qui n'est pas encore élucidée.

L'interprétation des résultats de l'examen du sperme rattachés au tableau clinique général, corrélatif à d'autres examens complémentaires (dosages hormonaux, biopsies testiculaires) ouvrent la voie à la compréhension pathogénique de l'insuffisance testiculaire et à l'application plus vaste des procédés thérapeutiques. Ces faits expliqueraient l'inefficacité de la thérapie endocrinienne (testostérone, prolan etc.) et même sa nocuité dans les troubles spermatogénétiques, d'origine nerveuse ou enzymatique.

Dans les insuffisances testiculaires l'examen du sperme pourrait constituer un test pour établir l'efficacité du traitement à la testostérone et à d'autres hormones.

La pathogénie des troubles de la spermatogénèse, confuse jusqu'à ces jours, est enfin en train d'être clarifiée et sous peu, le terme d'insuffisance testiculaire idiopathique sera remplacé par un terme y correspondant.

Nous espérons que la microscopie électronique du spermatozoïde, en facilitant les observations morphologiques structurelles qui échappent à l'étude au microscope optique, couronnera les recherches, en ouvrant à la science de nouvelles voies.

BIBLIOGRAPHIE

1. MANN, T. (1954), *The biochemistry of semen*. Ed. Methuen, London.
2. MILCOU, S. M., MAICANESCO, M., STOENESCO, D., TEODORESCO, E., DRAFTA, D. (1959), Étude de certaines formes d'insuffisance germinale, à l'aide de la biopsie testiculaire. II^e Congrès Mondial de Stérilité et Fertilité, Amsterdam, juin 1959, 611—614.
3. MILCOU, S. M., MAICANESCO, M., MAXIM-BERCEA, I., Rôle des facteurs nerveux dans la cytopathologie de la spermatogénèse. *Instit. d'Endocrinologie*, Bucarest, 18 avril 1960 (sous presse).
4. NOWAKOWSKY, H. (1955), Störungen der Keimdrüsenfunktion beim Manne. In: *Sexualität des Menschen*. F. Enke, Stuttgart, 417—447.
5. PITIS, M., BELLOIU, D., MAICANESCO, M., TEODORESCO, M. (1958), *Folia Endocrinol. (Pisa)*, **1**, 15—23.
6. SOULAIRAC, A., SOULAIRAC, M. L. (1958), La fonction spermatogénétique du testicule humain. Masson et Cie, Paris, 73—91.
7. STIEVE, P. H. (1952), *Der Einfluß des Nervensystems auf Bau und Tätigkeit der Geschlechtsorgane des Menschen*. Thieme, Stuttgart.

DER FRUKTOSEGEHALT IM SPERMAPLASMA VON NEKROSPERMIIEN

J. MOLNÁR

UROLOGISCHE KLINIK, MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT, BUDAPEST

Zusammenfassung

Die genuine, totale Nekrospermie gilt als Seltenheit. Öfters treffen wir aber ihre partiellen Formen. Wiederholt ergibt sich die Frage: Worin kann der Grund der Akinese liegen? Man könnte an eine Veränderung in der Struktur der Spermien oder in der Zusammensetzung des Spermaplasmas denken. Bei den partiellen Nekrospermien kann man den Grund des Ausfalles der Bewegung in der Spermienstruktur annehmen, da ja das Spermaplasma für alle Spermien ein gemeinsames Milieu bedeutet. Bei einer totalen Nekrospermie kann aber auch eine Änderung im Spermaplasma in Betracht kommen, namentlich ein Ausfall im Fruktosegehalt, d. h. in der Energiequelle. Da unter unseren 2600 Kranken nur ein einziger eine einwandfreie totale Nekrospermie hatte, zählten wir unsere 13 unvollkommenen Akinospermien diesem Falle zu. Auf Grund der Fruktosewerte fanden wir — außer in zwei Fällen — keinen so hohen Fruktoseausfall, der die Motilitätsstörung erklären hätte können. Die Ursache der Akinese scheint also in der Struktur der Spermien zu liegen. In einem Fall deutete der niedrige Fruktosewert auf ein kombiniertes Ausfallsbild.

Bei der echten totalen Nekrospermie handelt es sich bekanntermaßen um ein sehr seltenes Spermabild. Von Nekrospermie darf man nur sprechen, wenn im frisch entleerten (30 Minuten), bei Körpertemperatur aufbewahrten Ejakulat bewegliche Spermien trotz Anwendung von Belebungsverfahren nicht in Erscheinung treten. Hinzugefügt werden muß noch, daß die Nekrospermie im engsten Sinne des Wortes soviel bedeutet, daß die Samenzellen in ihrer Gesamtheit akinetisch sind, sonst aber quantitativ, ja möglichst auch in ihrer prozentualen Struktur nicht oder kaum von den Werten des normalen Ejakulats abweichen. Sämtliche Autoren sind sich darüber einig, daß unter diesen Kautelen *sehr wenige genuine Nekrospermien* vorkommen.

Im Zusammenhang mit der Akinese ergab sich vor allem die Frage, *wo der Grund des schweren Ausfalls zu suchen sei, in den Spermien oder in einer Veränderung der Zusammensetzung des Spermaplasmas?* Warum bewegen sich die Samenzellen nicht, obgleich die Voraussetzungen dafür gegeben sind?

Es darf wohl ausgesprochen werden, daß man *partieller Nekrospermie* bei jeder Ejakulatuntersuchung begegnet. Wie allgemein bekannt, sind selbst bei *Normospermie* 10—25% *Spermien genuin unbeweglich*, von denen sich nach Belebung, z. B. Erwärmung, nur einige wieder bewegen. Auch diese Veränderung kommt eher in zuckenden lokalen Kontraktionen zum Ausdruck — von Raumgewinn kann man keinesfalls sprechen. Die Erscheinung, daß die Bewegung hierbei in ihrer Gesamtheit lebhafter wird, hängt bereits mit anderen Fragen zusammen, beispielsweise mit der Fruktolyse, die jedoch nicht mehr zu unserem Thema gehört.

Je mehr das Sperma pathologisch ist, um so mehr unbewegliche Spermien enthält es; wir kennen die Parallelität dieses Vorgangs mit der Senkung der

Spermienzahl und des Prozentsatzes der über normale Struktur verfügenden Formen. Im extremen Fall vermindert sich die Zahl der beweglichen Spermien maximal.

Im wesentlichen handelt es sich also darum, daß *in den Ejakulaten neben mehr oder weniger beweglichen Formen immer auch mehr oder weniger bereits ursprünglich unbewegliche Samenzellen anwesend sind. Wäre dies denkbar, wenn eine Veränderung der Zusammensetzung im gemeinsamen Vehikel, im Spermaplasma, eingetreten wäre?* Wohl kaum. Wenn zufällig die Fruktosekonzentration im Plasma gesunken wäre, z. B. infolge Androgendefizit, so hätten darauf *sämtliche* Spermien mit trägerer Bewegung, geringerer Intensität der Bewegung und dann infolge rascher Erschöpfung der Energiequelle mit vorzeitigem Stillstand reagiert. Dieser Wirkung könnte sich keine einzige Spermie entziehen. (Auch dieses Bild ist bekannt: wir nennen es Asthenospermie, neuesten Hypokinospermie, doch können wir uns damit jetzt nicht beschäftigen.)¹

In obigen Fällen wäre es demnach verkehrt den Fehler im Spermaplasma, in den Fruktose- oder anderen Nährstoffverhältnissen zu suchen, vielmehr müssen wir uns, um eine Antwort zu finden, mit der strukturellen Läsion der unbeweglichen Spermien beschäftigen.

Offensichtlich sind die im normospermischen Bild sichtbaren unbeweglichen Spermien »ab testo« krank, geschädigt, was noch durch die Erfahrung bestärkt wird, daß *pathologische Zellformationen unter den unbeweglichen Formen in viel höherem Prozentsatz als unter den beweglichen Spermien anzutreffen sind.* Noch besser tritt dieses Verhältnis anlässlich der bei Oligohypospermien vorgenommenen Untersuchungen zutage.

Wie verhält es sich indessen, wenn wir es mit einer *totalen* Nekrospermie zu tun haben? Darf angenommen werden, daß es sich bei diesem Zustand eigentlich um das letzte, schwerste Stadium der Nekrospermien, gleichsam um maximale Hypokinospermie handelt? Bejahendenfalls würde sich der Bewegungsmangel aus einem strukturellen Fehler der Spermien ergeben und wäre als Folge der in den Hoden anwesenden Schädigung aufzufassen.

Oder stellen wir uns auf den Standpunkt, daß die Genese der totalen Nekrospermie von den verschieden starken partiellen Akinospermien abweicht und die Ursache des Leidens im veränderten Zustand des Spermaplasmas zu suchen sei?

Es ist hauptsächlich deshalb schwierig, diese Frage zu beantworten, weil *die totale Nekrospermie außerordentlich selten vorkommt.* Aus diesem Grunde vermögen wir der Frage nicht nur statistisch nicht näherzukommen, sondern uns auch kaum eine Meinung zu bilden. An Hand unseres Krankmaterials haben wir versucht, eine Antwort zu finden. Wir haben unsere Nekrospermiefälle zusammengestellt, aber da *nur 1 Fall auf 2600 Kranke* entfiel, der *in jeder Hinsicht* als Nekrospermie bezeichnet werden kann, mußten wir auch einige verwandte Fälle dazunehmen (Tab. 1). In diesen zeigten die Spermien zum Teil totale Akinese, zu der sich jedoch auch maximale Hypospermie gesellte, während im Samen von anderen Kranken — wenn auch nur hier und da — vereinzelte Spermien, gleichfalls neben maximaler Hypospermie, anzutreffen waren. Bei den meisten wurde die Spermafruktosebestimmung vorgenommen, um eventuell aus dem Vergleich der Befunde Schlüsse ziehen zu können.

Was ergab diese Zusammenstellung?

Tabelle 1
Fälle von Nekrospermie im Krankenmaterial der Urologischen Klinik

	Karth. No	Alter	ml	pH	Spermien-zahl	Motile Spermien	Hoden	Prostata	Diagnose	Fruktose mg %	Pathol. Formen	Bemerk.
1	1324	33	0,5 0,5		15 Mill./ejac	φ	● fest	normal, drüsig	Nekrosp. total + Hypospermie	ungenügend	allgem.	—
2	1614	25	2,7 4,0	7,0 8,0	86 Mill./ejac	einmal: 1-1	● fest	normal, drüsig	Nekrosp. maxim. + Olygospermie	392	50 %	—
3	1555	26	3,1		1-2/Blfd.	φ	● schlaff			abwesend	allgem.	—
4	1729	28	1,2	6,8	8-10/Blfd.	φ	● schlaff			128	allgem.	—
5	1788	45	2,4	7,5	vereinz. 1-1	φ	● atroph.		Total Nekrosp. +	187	allgem.	—
6	1103	25	3,4		3-6/Blfd.	φ.	● fest	normal, drüsig	Hyosp. maxim.	abwesend	teratoide	niedrigere 17-Ketosteroid-Werte
7	1194	26	3,2 1,8		8-10/Blfd.	φ	● fest	normal, flach		abwesend	allgem.	
8	1746	27	1,8 2,2	6,8 6,8	2-4/Blfd. 4-5/Blfd.	φ	● fest	normal, drüsig		36	allgem.	—
9	1329	24	1,4 2,0	7,5	4-5/Blfd.	einmal: 1	● fest	normal, flach		530	teratoide	Biopsie
10	1587	34	3,1 3,5		6-8/Blfd. 12-15/Blfd.	sehr vereinz. 1-1	● fest	normal, drüsig		480	80 %	—
11	1787	32	1,3 1,8	7,4 7,7	vereinz. 1-1	sehr vereinz. 1-1	● fest	normal, drüsig	Maxim. Nekrosp. +	350	allgem.	—
12	1768	38	2,2 2,7	7,4 7,4	vereinz. 1-1	sehr vereinz. 1-1	● fest		Hyosp. maxim.	148	allgem.	—
13	1758	32	4,2 5,0		2-3/Blfd.	sehr vereinz. 1-1	● fest	normal, drüsig		33	allgem.	nach 250 mg Testosteron Fructosew.: 265
14	1350	31	1,2		1-1/Blfd.	einmal: sehr vereinz. 1-1	● fest	normal, drüsig		abwesend	allgem.	Biopsie

Bei dem einzigen Kranken mit relativ hoher Spermienzahl und totaler Nekrospermie (Fall Nr. 1) vermochten wir trotz wiederholter Untersuchung die Fruktose nicht zu bestimmen, weil die Spermamenge zweimal nicht mehr als 0,5 ml ausmachte und wegen ihres mukösen Zustandes kaum Plasma ergab.

In einem anderen oligospermischen Ejakulat (Fall Nr. 2) sahen wir bei einer Untersuchung nur eine einzige (sich träge bewegende) Spermie. Der Fruktosewert war 392 mg%.

In den Fällen Nr. 3, 4 und 5 gesellte sich zur totalen Nekrospermie maximale Hypospermie. Die Spermien sämtlicher drei Kranken verfügten im allgemeinen über pathologische Struktur, doch trat die testikuläre Herkunft des Leidens auch bei der physischen Untersuchung zutage: *die Hoden dieser Kranken waren stark atrophisch*. Ihre Fruktosewerte waren zwar niedriger, aber höher als die untere Grenze des Normalwertes. In diesen Fällen war es denkbar, daß die Akinese tatsächlich dem extremen Grad der Hypokinospemie entsprach, d. h. der Fehler ausschließlich bei den Spermien lag.

Bei den Patienten Nr. 6 und 7 bestand totale Nekrospermie und maximale Hypospermie, während ihre Hoden dem Normalzustand entsprachen. Es waren frühere Kranke, die wir zur Nachuntersuchung bestellten, zu der sie leider nicht erschienen, weil sie sich angeblich unbekanntem Orts aufhielten.

In den Fällen Nr. 9, 10, 11, 12, 13 und 14 tauchte bei maximaler Hypospermie und Akinese hier und da eine sich — wenn auch schlecht — bewegende Spermie auf. In sämtlichen Fällen dominierten die pathologischen Formen. Die Hoden zeigten einen anscheinend einwandfreien Status. Bei 3 Kranken war der Fruktosegehalt im Spermaplasma hoch, während dieser Wert im Fall Nr. 12 148 mg% betrug und im Fall Nr. 13 auffallend niedrig war, nämlich 33 mg%. Allerdings stieg dieser Wert nach Verabreichung von 250 mg Testosteron auf 265 mg%, doch trat in den Bewegungsverhältnissen keine Veränderung ein.

Auf Grund der schweren Hypospermie muß trotz der scheinbaren Intaktheit der Hoden auch in obigen Fällen auf die Läsion des germinativen Gewebes als Ursache geschlossen werden. Der Mangel an Bewegung beruhte nicht auf dem Spermaplasma, sondern auf der strukturellen Läsion der Spermien. Wir erachten es als einen Fehler, daß wir bei diesen Kranken — mit Ausnahme von zweien — nicht auf der Durchführung der Hodenbiopsie bestanden haben, deren Ergebnis unsere Behauptung besser dokumentiert hätte.

Während in den bisher beschriebenen Fällen die Aufrechterhaltung des hypo- oder akinetischen Zustands auf die Spermien zurückgeführt werden konnte, muß der Fall des Kranken Nr. 8 als kombiniertes Bild bezeichnet werden. Auch hier lag maximale Hypospermie bei normalem Genitalzustand vor. Der Fruktosespiegel machte indessen nur 36 mg% aus, ein Wert, der bedeutend unter dem normalen liegt. Zugleich war die Verschiebung der Reaktion in Säurerichtung auffallend: $\text{pH} = 6,8$. Durch diesen niedrigen Wert wird die Bewegung bereits an und für sich stark beeinträchtigt. Sicherlich ergab sich die Säurekomponente nicht aus den milchsäureartigen Derivaten des abgebauten Kohlenhydrats, da ja kaum Spermien anwesend waren, welche die Fruktolyse ermöglicht hätten. Möglicherweise beruhte diese Verschiebung auf den schwach sauren Produkten der Prostata. In diesem Fall dürfte also die Akinese mehrere Gründe gehabt haben: 1. die pathologische Spermato-genese, 2. den niedrigen Fruktosespiegel, 3. das saure Medium. (Sekret der Prostata: Aplasie der Vesicula semin. oder Obliteration ihrer Ausführungs-

gänge?) Dies wäre somit der einzige Fall, wo auch die Zusammensetzung des Spermaplasmas für den Ausfall der Bewegung verantwortlich zu machen war.

Unsere Zusammenstellung ist angesichts des seltenen Vorkommens der Nekrospermie bescheiden. Wenn überhaupt von einer Schlußfolgerung gesprochen werden darf, so läßt sich sagen, *daß die Ursache des Ausfalls bei Nekrospermie vor allem in den Spermien gesucht werden muß. Der defizitäre Zustand des Spermaplasmas als eine die Unbeweglichkeit aufrechterhaltende Ursache kommt viel seltener vor.* Dessenungeachtet müssen die Fruktoseverhältnisse in jedem Fall geklärt werden. Wenn die Untersuchung den Mangel an diesem Kohlenhydrat bestätigt, so befinden wir uns in bezug auf die Korrektur in einer günstigeren Lage. Mit Androgen läßt sich dieser Wert gegebenenfalls (wie in unserem Fall Nr. 11) erhöhen, und im Falle einer entsprechenden Spermienzahl und Zellstruktur erscheinen gewisse Hoffnungen in bezug auf die Fertilität gerechtfertigt. Leider ist dies der seltenere Fall. Die Normalisierung der geschädigten Spermien, d. h. die Korrektur der germinativen Läsion, ist eine viel schwerere Aufgabe und mit Hilfe der üblichen Therapie (Gonadotropine, Rebound- Verfahren usw.) im allgemeinen kaum zu lösen.

Wir glauben, *die Nekrospermie in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle berechtigterweise auf eine Schädigung der Spermien zurückführen zu müssen.*

DIE KLINISCHE BEDEUTUNG DER AMINOSÄUREN IM MENSCHLICHEN EJAKULAT

R. DOEFFMER

UNIVERSITÄTS-HAUTKLINIK, BONN

Zusammenfassung

Mit der von KRAMPITZ ausgearbeiteten säulenchromatographischen Methode wurden im menschlichen Ejakulat qualitativ und quantitativ basische, saure und amphotere Aminosäuren bestimmt. Die eigenen Ergebnisse wichen qualitativ und quantitativ wesentlich von den Resultaten mit der papierchromatographischen Methode ab. Beim gleichen Individuum war der Gehalt der Aminosäuren weitgehend konstant, sofern der Spermaliquor zu bestimmten gleichen Zeiten nach der Ejakulation untersucht wurde. Bei Oligo-Asthenoteratospermien und bei Azoospermien mit Leydigzellinsuffizienz sowie einer Aspermie infolge Mißbildung der akzessorischen Geschlechtsdrüsen wiesen die verschiedenartigen Aminosäuren einen deutlichen Abfall gegenüber Normospermien auf. Der Gehalt der Aminosäuren dürfte ebenso wie der Fruktosegehalt weitgehend von einer normalen Funktion der Leydigzellen abhängen. Primäre Hodenschäden mit Oligo-Asthenoteratospermien oder Azoospermien ohne Leydigzellinsuffizienz ließen keine wesentlichen Abweichungen von Normospermien erkennen. Die Anfertigung eines Aminosäurendiagramms erfordert etwa 2 Tage Dauer. Die Bestimmung der Aminosäuren ist daher für Routineuntersuchungen wie die Fruktosebestimmung zunächst nicht geeignet.

Über die Rolle der Motilität und insbesondere der Qualität der Motilität, d. h. der Intensität der Vorwärtsbewegung beim Zustandekommen einer Befruchtung besteht ebenso wie vor 4 Jahrzehnten bei der Geburt der Spermatozoologie keine Einigkeit. Einige Autoren [4, 16 usw.] nehmen an, daß auch unbewegliche Spermien infolge von Muskelkontraktionen bis in die Tube vordringen können. Die Ergebnisse an einem sehr großen Krankengut von MACLEOD und GOLD [9] sprechen jedoch dafür, daß die Qualität der Motilität doch ein wesentliches, wenn nicht das wesentlichste Charakteristikum für die Bedeutung der Zeugungsfähigkeit darstellt.

Wenig erforscht ist bis heute, ob Spermien aus dem Spermaliquor, aus den Zervixsekreten oder aus den Sekreten des Uterus oder der Tube Substanzen als Energiequelle aufnehmen können. Bei einem normalen Geschlechtsverkehr wandern bei normaler Gonadentätigkeit des Mannes und der Frau die Spermien in wenigen Sekunden oder Minuten in das Zervixsekret. Da mit Sicherheit der Spermaliquor nicht durch das Zervixsekret zu dringen vermag, ist in der Regel der Spermaliquor nicht als Energiequelle für die Motilität der Spermien zu betrachten.

Zahlreiche biochemische Untersuchungen des Ejakulats [10, 14, 17] brachten keine sicheren darstellerischen Hinweise über die Befruchtungsfähigkeit der Spermien. Lediglich der Fruktose- und Inositgehalt des Spermaliquors gab Aufschlüsse über die Funktion der Leydigzellen, und zeigte eine mögliche Ursache der Infertilität auf [14]. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von

Tierversuchen [10] fanden SCHIRREN [14] und NIERMANN [12] beim Menschen keine sicheren Beziehungen zwischen dem Zitronensäuregehalt des Spermaliquors und der Leydigzellenfunktion. Die Bestimmung der Fruktolyse, d. h. des Fruktoseverbrauchs und somit des Abbaues der Fruktose in einem gewissen Zeitabschnitt nach der Ejakulation gab gewisse Aufschlüsse über das Stoffwechselfgeschehen der Spermien, zeigte jedoch ebensowenig wie die Bestimmung der Hyaluronidase oder anderer Fermentkomplexe sichere Anhaltspunkte für die Konzeptionsfähigkeit der Spermien.

Über die Bedeutung der Aminosäuren im Spermaliquor liegen beim Menschen nur wenige Untersuchungen vor.

ADAM und KORTING [1], JACOBSEN [3] und LUNDQUIST [8] bestimmten die Aminosäuren im menschlichen Sperma qualitativ und KEUTEL und GABSCH [5] quantitativ mit der papierchromatographischen Methode. SAKAR, LUECKE und DUNCAN [13] trennten die Aminosäuren mikrobiologisch. Nach GASSNER nahmen die freien Aminosäuren im Spermaliquor ebenso wie die Fruktose und die Aminosäuren nach der Kastration ab; durch Substitution von Testosteron konnte jedoch der Aminosäuregehalt nicht wieder normalisiert werden.

Nach TYLOR und LORD ROTHSCHILD bewirkte der Zusatz von Aminosäuren zur Suspension in Seewasser eine starke Verlängerung der Dauer der Beweglichkeit und Befruchtungsfähigkeit von Seeigeln. Die Aminosäuren wurden bei diesem Geschehen durch Stoffwechselvorgänge nicht verbraucht. Es trat jedoch ein langsamer Abbau ein, so daß möglicherweise das eigentlich wirksame Agens das hierbei ständig gelieferte Ammoniak war.

In diesem Zusammenhang sind auch die Ergebnisse von DOEPFNER und FREIHOFF zu erwähnen, die durch Zusatz von Aminosäurechlorid die Motilität und die Motilitätsdauer von Hodenspermien von Meerschweinchen auf 56 Stunden und von Menschen auf 30 Stunden verlängern konnten.

Unsere Untersuchungen galten den Fragen, ob der Gehalt der verschiedenartigen Aminosäuren ähnlich wie der Gehalt der Fruktose oder des Inosit beim Menschen von einer normalen Funktion der Leydigzellen abhängig ist. Weiterhin prüften wir den Aminosäuregehalt bei Patienten mit Normospermien, Oligo-Astheno-Teratospermien und Azoospermien und insbesondere die quantitativen Mengen der verschiedenen Aminosäuren in kurzen Zeitabständen nach der Ejakulation.

Die quantitativen Bestimmungen der Aminosäuren im menschlichen Ejakulat sind kompliziert und außerordentlich kostspielig. Bisher wurden für die Erfassung der Aminosäuren durch Trennung der Eiweißbausteine folgende Methoden angewandt:

1. Das mikrobiologische Verfahren, bei dem das Wachstum bestimmter Testbakterien geprüft wird, die zu ihrer Existenz gewisse, von Art zu Art verschiedene Aminosäuren benötigen. Dieses Verfahren ist sehr empfindlich und spezifisch, läßt sich jedoch nur zur qualitativen Auswertung heranziehen.

2. Das papierchromatographische Verfahren eignet sich vorwiegend nur für qualitative Untersuchungen.

Nach KOFRANYI [6] soll die Fehlerbreite bei einer quantitativen papierchromatographischen Bestimmung bei etwa $\pm 30\%$ liegen. Die papierchromatographische Methode ist einfach und schnell durchführbar, jedoch für quantitative Auswertungen in der Regel nicht geeignet.

3. Das säulenchromatographische Verfahren dürfte nach den heutigen Kenntnissen für die quantitative Bestimmung der Aminosäuren die Methode der Wahl sein.

Die Technik dieses Verfahrens wurde eingehend von KRAMPITZ [7] dargestellt. Die Genauigkeit dieser Methode liegt nach unseren Erfahrungen bei $\pm 1\%$. Die Nachteile dieses Verfahrens sind durch den hohen Kostenpunkt und den riesigen Zeitaufwand gegeben. Zur Durchführung einer Vollanalyse von komplizierten Aminosäuregemischen wie sie im Sperma vorhanden sind, benötigt man 2 Tage.

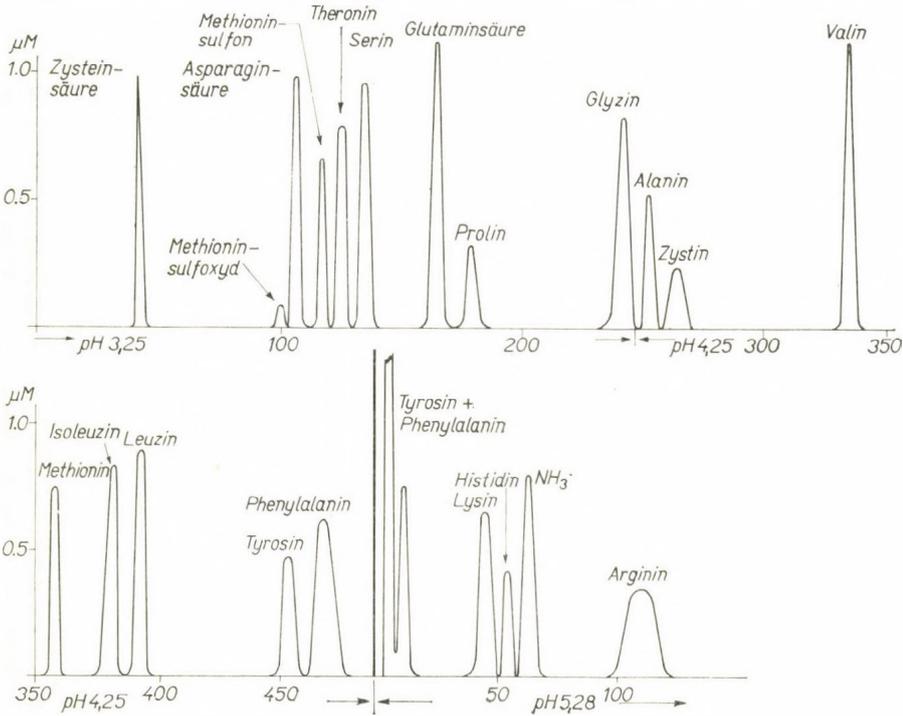


Abb. 1. Normales Diagramm der verschiedenen Aminosäuren im menschlichen Ejakulat

Für unsere eigenen, gemeinsam mit KRAMPITZ durchgeführten Untersuchungen versetzten wir etwa 4 bis 6 Stunden nach der Ejakulation den Spermaliquor mit einem Überschuß an 1%iger Pikrinsäure, um die vorhandenen Proteine zu entfernen. Wir untersuchten 10 Patienten mit Normospermien, 5 mit Oligo-Astheno-Teratospermien, 5 mit Azoospermien und 1 Patienten mit Aspermie, die durch eine Mißbildung der samenabführenden Wege und Bläschendrüsen bedingt war.

Die Abbildung 1 zeigt ein Diagramm, auf dem die verschiedenen Aminosäuren aus einem Spermaliquor eines Patienten mit einer Normospermie dargestellt sind.

In der Tabelle 1 haben wir unsere Ergebnisse den papierchromatographisch ermittelten Befunden von KEUTEL und GABSCH [5] sowie den säulen-

Tabelle 1
Aminosäuren im menschlichen Ejakulat und Blutplasma

Amphotere Aminosäuren mg/ccm	KEUTEL und GABSCH [5]		Eigene Untersuchungen			
	Normo- spermie	Normo- spermie	Oligo- spermie	Azoospermie	Aspermie bei Miß- bildung der Bläschen- drüsen + Prostata	Blutplasma
Glutathion	0,17	—*	—	—	—	—
Methionin	0,047	0,038	0,021	0,007	0,011	0,0008
Zystin	11,7	0,034	0,002	0,006	0,015	0,010
Zystein	9,0	—**	—	—	—	—
Taurin	19,8	—***	—	—	—	0,004
Glyzin	6,4	0,589	0,251	0,230	0,071	0,018
Oxyprolin	11,6	—	—	—	—	—
Alanin	0,52	0,291	0,141	0,096	0,043	0,036
Prolin	2,2	0,269	0,100	0,139	—	0,016
Tyrosin	0,8	0,514	0,207	0,232	0,101	0,009
Valin	0,8	0,498	0,240	0,134	0,100	0,037
Phenylalanin	0,15	0,282	0,146	0,164	0,112	0,009
— Diaminobuttersäure	0,55	—	—	—	—	—
Threonin	4,15	0,477	0,282	0,190	0,115	0,012
Tryptophan	0,076	—	—	—	—	—
Serin	0,75	1,116	0,560	0,429	0,104	0,010
β-Alanin	—	0,360	0,109	0,158	0,152	—
β-Aminoisobuttersäure	—	0,317	0,171	0,053	—	—
Isoleuzin }		0,624	0,259	0,191	0,087	0,023
Leuzin }	0,3	0,967	0,506	0,332	0,228	0,013
	69,013	6,426	2,995	2,361	1,139	0,1978
Säure, Aminosäuren, mg/ccm						
Asparaginsäure	5,6	0,998	0,458	0,336	0,187	0,007
Glutaminsäure	0,95	1,797	1,193	1,552	0,397	0,094
	6,55	2,795	1,651	1,988	0,584	0,101
Basische Aminosäuren mg/ccm						
Arginin	1,88	0,790	0,310	0,295	0,094	0,014
Lysin	0,8	1,521	0,587	0,580	0,183	0,027
Ornithin	0,47	— ¹	—	—	—	0,007
Histidin	1,97	1,091	0,443	0,398	0,079	0,014
	5,12	3,402	1,340	1,773	0,356	0,062

* hydrolisiert

** wird als Zystin bestimmt

*** Bestimmung ungenau

¹ nicht gefunden

chromatographisch ermittelten Befunden im Blutserum gegenübergestellt. Die mit unserer Methode erzielten Resultate unterschieden sich wesentlich von den Ergebnissen KEUTELS und GABSCH' [5] in folgenden Punkten:

Tabelle 2

Die Aminosäuren im menschlichen Ejakulat nach den Ergebnissen verschiedener Autoren

	KEUTEL und GABSCH [5]	SAKAR, LUECKE und DUNCAN [13]	LUND- QUIST [8]	ADAM und KORTING [1]	Eigene Unter- suchungen
Methionin	+	+	-	-	+
Zystin	+	-	+	-	+
Zystein	+	-	-	-	+
Taurin	+	-	-	-	-
Glyzin	+	-	+	+	+
Oxyprolin	+	-	-	-	-
α -Alanin	+	-	+	+	+
β -Alanin	-	-	-	-	+
Prolin	+	-	+	-	+
Tyrosin	+	-	+	+	+
Valin	+	+	+	+	+
Phenylalanin	+	+	+	-	+
α , γ -Aminobuttersäure ...	+	-	-	-	+
Threonin	+	+	+	+	+
Tryptophan	+	+	-	+	-
Serin	+	-	+	+	+
Leuzin	+	+	+	+	+
Isoleuzin	+	+	+	+	+
Asparaginsäure	+	-	+	+	+
Glutaminsäure	+	+	+	+	+
Arginin	+	+	+	+	+
Lysin	+	+	-	-	+
Ornithin	+	-	-	-	-
Histidin	+	+	-	+	+
Glutathion	+	-	-	-	+

1. Das Peptid-Glutathion erfaßten wir nicht, da es bei der HCl-Hydrolyse in seine Bausteine zerlegt wurde.

2. Zystein wurde nach dem von uns verwendeten chromatographischen Verfahren als Zystin erfaßt.

3. Taurin-Werte führten wir nicht auf, da Taurin auf der Eluierungskurve von einer anderen, bisher unbekanntem Ninhydrin-positiven Komponente überlagert wurde.

4. Tryptophan geht bei der Hydrolyse verloren.

5. Oxyprolin, α -Aminobuttersäure und Ornithin konnten wir nicht nachweisen.

6. Dagegen trennten wir β -Alanin von β -Aminoisobuttersäure und wiesen diese beiden Aminosäuren quantitativ nach.

In der Tabelle 2 sind die qualitativen Ergebnisse verschiedener Autoren gegenübergestellt.

Besonders hohe Werte fanden wir bei Serin, Leuzin, Glutaminsäure, Lysin und Histidin.

Besprechung

Bei den in der Tabelle aufgezeichneten Werten der einzelnen Aminosäuren handelt es sich um Durchschnittswerte, die 4 bis 6 Stunden nach der Ejakulation im Spermaliquor gefunden wurden. Die von einigen Autoren angegebenen starken Anstiege der Aminosäuren nach der Ejakulation konnten wir auf Grund der bisherigen Untersuchungen nur bei einem Teil der untersuchten Ejakulate feststellen. Die im Spermaliquor nachgewiesenen Aminosäuren werden nach den bisherigen Erkenntnissen in den Bläschendrüsen und in der Prostata gebildet. Die akzessorischen Geschlechtsdrüsen sind Erfolgsorgane der Leydigzellen. Verminderte Werte an Aminosäuren können sowohl bei primären als auch bei sekundären Hodenschäden mit einer Leydigzellinsuffizienz vorliegen. Ebenso können bei Mißbildungen der akzessorischen Geschlechtsdrüsen bei völlig normaler Leydigzellfunktion die Werte — wie bei einer eigenen Beobachtung — stark verändert sein. Auffällig war, daß verminderte Aminosäurewerte nicht stets parallel mit einem herabgesetzten Fruktosegehalt gingen.

Bei Azoospermien oder hochgradigen Oligo-Asthenoteratospermien mit gleichzeitigen Leydigzellveränderungen, die histologisch oder durch den erniedrigten Fruktosegehalt diagnostiziert wurden, waren jedoch die Werte deutlich herabgesetzt. Die Befunde sprechen dafür, daß die normale Produktion von Aminosäuren von einer normalen Funktion der Leydigzellen bzw. von einer normalen Tätigkeit der akzessorischen Geschlechtsdrüsen abhängt.

Bei isolierten Tubulusschäden, z. B. bei einem Spermiogenesestop ohne Leydigzellinsuffizienz fanden wir annähernd gleiche Werte wie bei einer Normospermie.

Erwähnenswert erscheint uns auch die Tatsache, daß beim gleichen Individuum die Aminosäurewerte wenig schwankten. Über die Beziehungen der amphoter, sauren und basischen Aminosäuren zueinander bei den verschiedenartigen Tubulusschäden können wir heute keine sichere Aussage machen. Ebenso unklar ist bis heute nach der Ejakulation der unterschiedliche Anstieg der verschiedenen Aminosäuren.

LITERATUR

1. ADAM, W., KORTING, G. W. (1955), *Dtsch. med. Wschr.*, 219.
2. CONSDEN, R. A., GORDON, A. H., MARTIN, J. P. (1944), *Biochem. J.*, **38**, 224.
3. JACOBSEN, L. (1950), *Acta physiol. scand.*, **20**, 88.
4. JOËL, C. A., POLLAK, O. I. (1939), *Mshr. Geburtsh. Gynäk.*, **109**, 91.
5. KEUTEL, H. J., GABSCH, H. C. (1958), *Urol. int.*, **6**, 206.
6. KOFRANYI, E. (1955), *Z. physiol. Chem.*, **289**, 129.

7. KRAMPITZ, G. (1960), *Z. Tierphysiol., Tierern. u. Futtermittelkunde*, **15**, 40.
8. LUNDQUIST, F. (1952), *Acta physiol. scand.*, **25**, 178.
9. MACLEOD, J., GOLD, R. Z. (1951), *Fertil. and Steril.*, **2**, 187.
10. MANN, S., STEIN, W. H. (1951), *J. biol. Chem.*, **192**, 663.
11. MOORE, S., SPACKMAN, D. H., STEIN, W. H. (1958), *Analyt. Chem.*, **30**, 1185.
12. NIERMANN, H. (1961), *Arch. klin. exp. Derm.*, **213**, 774.
13. SAKAR, B. C. R., LUECKE, R. W., DUNCAN, C. W. (1947), *J. biol. Chem.*, **171**, 463.
14. SCHIRREN, C. (1955), *Medizinische*, 872.
15. SPACKMAN, D. H., STEIN, W. H., MOORE, S. (1958), *Analyt. Chem.*, **30**, 1190.
16. VAN DEMARK, N. L., HAYS, R. L. (1954), *Fertil. and Steril.*, **5**, 131.
17. VASTERLING, H., W. (1960), *Praktische Spermatologie*. Thieme, Stuttgart.

ÜBER DIE CHROMATOGRAPHISCHE BESTIMMUNG VON AMINOSÄUREN IM MENSCHLICHEN SPERMA*

G. KRAMPITZ

INSTITUT FÜR ANATOMIE UND PHYSIOLOGIE DER HAUSTIERE, UNIVERSITÄT, BONN

Zusammenfassung

Es wird das Prinzip der chromatographischen Bestimmung von Aminosäuren sowie eine Apparatur zur Durchführung der Bestimmung beschrieben.

Die quantitative Bestimmung von Aminosäuren hat für die Untersuchung von Proteinen und Peptiden etwa die gleiche Bedeutung wie die Elementaranalyse für einfache chemische Verbindungen.

An der Bestimmung von Aminosäuren ist nicht nur der Proteinchemiker, sondern auch der Mediziner interessiert. Der Mediziner möchte sich vor allem über die Gehalte an einzelnen Aminosäuren in den Körperproteinen sowie in den Körperflüssigkeiten und nicht zuletzt über die qualitative und quantitative Zusammensetzung der Samenflüssigkeit an Eiweißbausteinen informieren. Im Laufe des letzten Jahrzehntes sind viele erfolgreiche Versuche unternommen worden, um die Bestimmung von Aminosäuren im biologischen Material möglichst genau, sicher und einfach zu gestalten. Von allen bislang beschriebenen Verfahren haben die chromatographischen Methoden nach MOORE und STEIN die genannten Forderungen am ehesten erfüllt [2, 3, 4].

Das *Prinzip* des Verfahrens besteht darin, daß praktisch alle Aminosäuren an einem sauren Kationenaustauscherharz adsorbiert und anschließend mit Pufferlösungen von steigendem pH-Wert eluiert werden. Die aus den genannten Harzsäulen austretenden Aminosäure-Zonen können entweder mit Hilfe eines Fraktionssammlers portionsweise aufgefangen oder mittels einer von uns benutzten automatischen Apparatur quantitativ bestimmt werden. Dabei wird in das Eluat kontinuierlich eine Ninhydrinlösung eingespritzt und das Gemisch von Eluat und Ninhydrinlösung durchläuft eine auf 100° C erhitzte Teflonspirale; dort entwickelt sich die typische blau-violett-Färbung bei Anwesenheit von ninhydrin-positiven Substanzen. Die Färbung wird danach fortlaufend photometrisch gemessen und registriert.

Im folgenden sollen die einzelnen Bauelemente und ihre Wirkungsweise erläutert werden.

1. Austauschersäule

In der Apparatur sind 3 Säulentypen von jeweils 0,9 cm innerem Durchmesser eingebaut, die mit Austauschern vom Typ Amberlite IR 120 beschickt werden. Die Säulen sind doppelwandig ausgeführt und bei 30 bzw. 50° C thermostatisiert. Zur Druckkontrolle sind Manometer eingebaut. Die Länge der Säulen beträgt 150, 50 und 15 cm. In der 150 cm-Säule werden die sauren

* Vorgetragen von R. Doepfner

und neutralen Aminosäuren getrennt. Die Elution erfolgt automatisch in zwei Stufen: zuerst mit Na-Zitrat-Pufferlösung pH 3,25, anschließend mit einer Na-Zitratlösung pH 4,25. Die 15 cm-Säule dient zur Trennung einfacher basischer Gemische wie sie in Proteinhydrolysaten vorliegen. [Die Elution erfolgt bei pH 5,28 (Na-Zitrat-Pufferlösung).] Die 50 cm-Säule wird bei der Trennung von komplizierten Gemischen basischer Aminosäuren in physiologischen Flüssigkeiten verwendet. Sie wird analog der 15 cm-Säule behandelt.

2. Druckpumpen

Wir verwenden Plexiglas-Druckpumpen, die einen konstanten Druck und einen konstanten Fluß aller Lösungen gewährleisten. Die Durchflußgeschwindigkeit für Puffer- und Ninhydrinlösungen beträgt 30 ml/h.

3. Luftabscheider

Für eine reproduzierbare Durchführung der Ninhydrinreaktion ist es erforderlich, den Luftsauerstoff aus allen Pufferlösungen zu entfernen. In den Luftabscheidern durchströmen die einzelnen Pufferlösungen eine von außen erwärmte Schicht von Glaswolle. Dabei wird die Luft in Form kleiner Bläschen frei. Die Ninhydrinlösung wird unter Stickstoff aufbewahrt.

4. Reaktionsbad

In dem auf 100° C thermostatisierten Reaktionsbad befindet sich der zu einer Spirale gewickelte Teflonschlauch. Der Durchmesser beträgt 0,7 mm, seine Länge etwa 40 m.

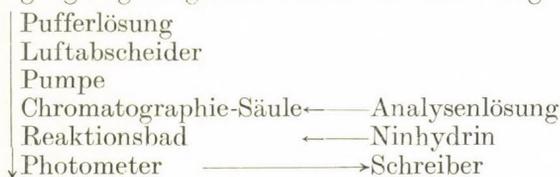
5. Photometer

Aus dem Reaktionsbad fließt die Lösung zum Photometeraggregat. Dieses Aggregat enthält drei nacheinander geschaltete Photometereinheiten. Die erste und die dritte Einheit messen bei einer Wellenlänge von 570 μm den blauen Farbstoff aus der Reaktion zwischen Ninhydrin und Aminosäuren. Die erste Einheit besitzt eine Küvette von 2,2 mm Schichtdicke, die dritte Einheit enthält eine Küvette von 0,7 mm Schichtdicke. Dadurch registriert der Schreiber 2 Kurven in verschiedenen Extinktionsbereichen. Die mittlere Photometereinheit mißt bei einer Küvetten-Schichtdicke von 2,2 mm und einer Wellenlänge von 440 μm die Extinktion des gelben Farbstoffes aus Ninhydrin mit Prolin bzw. Oxyprolin. Ein entsprechendes Photometeraggregat ist vom technischen Büro der Firma Beckmann Instruments in Düsseldorf angefertigt worden [1].

6. Schreiber

Der Schreiber umfaßt den Extinktionsbereich von 0—2,0. Der Papierorschub beträgt 60 mm/h. Die von den drei Photometern ausgehenden Signale werden als verschiedenfarbige Punkte in 4 Sekunden-Punktfolge auf das Papier aufgedruckt.

Dem Analysengang liegt folgendes Funktionsschema zugrunde:



Die Genauigkeit der beschriebenen Methode liegt nach unseren Erfahrungen bei $\pm 1\%$. Das hohe Auflösungsvermögen der Ionenaustauschersäulen gestattet es, bis zu 50 ninhydrin-positive Komponenten zu trennen und quantitativ zu bestimmen. Der entscheidende Nachteil dieses Verfahrens liegt aber in seinem hohen Kosten- und Zeitaufwand. Zur Durchführung einer Vollanalyse von komplizierten Aminosäuregemischen, wie sie im Sperma vorliegen, benötigt man 2 Tage.

Zur Bestimmung freier Aminosäuren im Sperma gehen wir nach folgendem Arbeitsplan vor:

Frischsperma wird zunächst mit einem Überschuß an 1%iger Pikrinsäurelösung versetzt, um die vorhandenen Proteine zu entfernen. Nach Abzentrifugieren des Niederschlages wird das Überstehende quantitativ durch ein Kieselgurfilter geklärt; danach wird die überschüssige Pikrinsäure mit Hilfe eines basischen Anionenaustauscherharzes (Dowex 1×8) entfernt. Nachdem orientierende Vorversuche mittels Papierchromatographie gezeigt haben, daß eine Reihe von nicht identifizierbaren Peptiden mit freien Aminosäuren vergesellschaftet vorkommen, hydrolysieren wir das aminosäurehaltige Eluat der Dowex 1×8 — Kolonnen.

Die Aufklärung der Struktur der genannten Peptide stellte uns vor ein nicht zu bewältigendes Arbeitsprogramm. Die Hydrolyse erfolgt mittels 6 n HCl, wobei pro 1 ml Ausgangsspermavolumen 100 ml 6 n HCl verwendet werden. Die Hydrolyse erstreckt sich über 24 Stunden bei 100° C. Dabei nahmen wir allerdings den Verlust von Tryptophan in Kauf. Nach der Hydrolyse werden eventuell vorkommende Huminstoffe abfiltriert, und die Salzsäure läßt sich dann leicht im Rotationsverdampfer entfernen. Die getrockneten Hydrolysate werden mit einem Na-Zitrat-Puffer auf pH 22 gebracht, wobei auf das Ausgangsvolumen des Ejakulats aufgefüllt wird. Nur 0,5 ml dieser Lösung verwenden wir zur Chromatographie auf der eingangs beschriebenen Apparatur. Mit Hilfe des angegebenen Arbeitsganges ist es möglich, unter Verwendung von nur sehr geringen Mengen an Ausgangsmaterial, alle im menschlichen Sperma vorkommenden Aminosäuren eindeutig zu erfassen, voneinander zu trennen und mit hoher Genauigkeit zu bestimmen.

LITERATUR

1. BECKMANN-Report (1959), 1.
2. MOORE, S., SPACKMAN, D. H., STEIN, W. H. (1958), *Analyt. Chem.* **30**, 1085.
3. SPACKMAN, D. H., STEIN, W. H., MOORE, S. (1958), *Analyt. Chem.* **30**, 1090.
4. STEIN, W. H., MOORE, S. (1954), *J. biol. Chem.*, **211**, 915.

QUANTITATIVE HISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN AN SPERMIEN

W. SANDRITTER und K. D. GROSSER*

SENCKENBERGISCHES PATHOLOGISCHES INSTITUT DER UNIVERSITÄT, GIESSEN/L.

Zusammenfassung

Es wird eine Übersicht der quantitativen histochemischen Methoden speziell im Hinblick auf Untersuchungen an Spermien gegeben.

Mit der Mikrophotometrie im ultravioletten Licht kann der Nukleinsäuregehalt, nach Ribonukleasebehandlung auch der DNS-Gehalt von Spermien gemessen werden. Die Versuche zeigen, daß der DNS-Gehalt der Spermien die Hälfte der diploiden Zellen beträgt. Für Probleme der Infertilität ergeben sich aus DNS-Messungen neue Gesichtspunkte.

Am Beispiel der Farbstoffaufnahme von basischen Farbstoffen kann die elektronenmikroskopisch nachgewiesene dichte Packung der DNS-Proteinmoleküle demonstriert werden.

Für den Nachweis der Zellkernproteine stehen verschiedene Farbreaktionen zur Verfügung, die im Zusammenhang mit der Umwandlung von Histoneiweißkörpern in protaminähnliche Eiweißkörper während der Spermienogenese diskutiert werden.

Mit dem Interferenzmikroskop und der Röntgenhistoradiographie kann das Trockengewicht der Spermienzellkerne gemessen werden. Die Untersuchungen ergaben bestimmte Gesetzmäßigkeiten hinsichtlich der Trockengewichte von nichthistonproteinfreien Zellkernen (Korrelation — Trockengewicht mit Chromosomenzahl). Spezifische Extraktionsmethoden und die Kombination des Interferenzmikroskopes mit der UV-Photometrie erlauben eine quantitative Aufschlüsselung des Substanzgehaltes (Lipoide, RNS, DNS, Protein) von Spermien.

Seit MIESCHERS [35] Entdeckung der »Nukleinstoffe« im Jahr 1870 sind unsere Kenntnisse über diese wichtige Stoffklasse durch biochemische und histochemische Untersuchungen stark erweitert worden. Viele Argumente sprechen dafür, daß die Nukleinsäuren als Träger der genetischen Information im Zellkern auftreten [4, 11]. Besonderes Interesse verdienen dabei nicht nur die somatischen Zellkerne, sondern vor allem die für die Erhaltung des Fortbestandes des Lebens so wichtigen Germinationszellen. Die Unterschiede in der chemischen Zusammensetzung beider Zelltypen, insbesondere hinsichtlich ihrer Proteine, die mit der DNS salzartig verbunden sind (Histone, Protamine), erscheinen im Lichte der von DANIELLI [16] und STEDMAN [55] formulierten Hypothese über die Histone als Genregulatoren von prinzipieller Bedeutung. Die zyklische Umwandlung von Histoneiweißkörper in Protamine oder protaminähnliche Eiweißkörper bei der Spermienreifung [35, 26, 21, 58, 10] und Rückverwandlung in Histoneiweißkörper in der befruchteten Eizelle bzw. den somatischen Zellkernen ist dabei in ihrem Wesen noch ganz ungeklärt.

Mit den modernen Methoden der quantitativen Histochemie kann parallel zu biochemischen Untersuchungen ein wesentlicher Beitrag zu diesen Fragen geleistet werden. Die Vorteile dieser mikrophotometrischen Methode liegen

* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

hierbei in dem mikroskopisch lokalisierbaren Nachweis von bestimmten chemischen Substanzen und der quantitativen oder halbquantitativen Mengenbestimmungen in der Größenordnung von 10^{-12} g an der Einzelzelle oder bestimmten Zellorten. Hierbei wird die natürliche Absorption z. B. der Nukleinsäuren oder die Lichtabsorption von eingeführten Chromophoren nach spezifischer und quantitativer Färbung nach den Gesetzen der »Makro«-Photometrie ausgenutzt [14]. Das Interferenzmikroskop [19, 50, 51, 54] und die Röntgenhistoradiographie [20, 38, 45] stellen mit der Möglichkeit von Massenbestimmungen (Trockengewicht) eine weitere wertvolle Bereicherung unserer methodischen Möglichkeiten dar.

Speziell für die Untersuchung von Spermien stehen heute eine Reihe von quantitativen Methoden, insbesondere zum Nachweis der Nukleinsäuren und Eiweißkörper zur Verfügung, die in Tabelle 1 aufgeführt sind. Die älteste, gleichzeitig z. Z. am meisten benutzte spezifische und halbquantitative Farb-reaktion für DNS stellt die Feulgen-Reaktion dar. Mit der Photometrie im UV-Licht [14] (CASPERSSON) können beide Nukleinsäuren quantitativ erfaßt werden [43], nach Ribonukleasebehandlung auch DNS allein [47].

Für Eiweißkörper verdanken wir ALFERT [1] mit der Fastgreenfärbung bei pH 8,2 eine geniale Methode, die nach der Entfernung der DNS die freien basischen Gruppen der Histoneiweißkörper darstellt, während Protamine nicht angefärbt werden (Lösung in Trichloressigsäure). Für Protamine bringt die Pikrinsäurebromphenolblaufärbung oder Eosin-Y-Färbung von BLOCH [10] einen wesentlichen Fortschritt, da die Pikrinsäure Protamine präzipitiert und gleichzeitig DNS hydrolysiert. Die quantitative Auswertbarkeit steht allerdings noch offen [31]. Desaminierung und Azetylierung lassen zudem eine Unterscheidung zwischen lysinhaltigen Histoneiweißkörpern und argininreichen Eiweißkörpern (Protamine) zu. Auch die Argininreaktion [32] kann dazu herangezogen werden, während mit der Millon-Reaktion, gekuppelten Tetrazoniumreaktion [7, 12] sowie der UV-Photometrie bei λ 280 $m\mu$ tyrosin- und tryptophanhaltige Eiweißkörper [42], d. h. im wesentlichen Nichthistonproteine der somatischen Zellkerne [36] erfaßt werden.

Freie basische Gruppen der Eiweißkörper sind mit sauren Farbstoffen in sauren Lösungen auch quantitativ zu bestimmen [53]. SH-Gruppen sind nach der DDD-Reaktion von BARNETT und SELIGMAN [6], SS- und SH-Gruppen nach TEIGER und Mitarb. [57] nachweisbar [5, 44]. Für den Kohlenhydratnachweis (α -Glykole) soll nach SCHRADER und LEUCHTENBERGER [53] auch die PAS-Reaktion quantitativ auswertbar sein.

Mit der Interferenzmikroskopie und Röntgenhistoradiographie stehen zwei Methoden zur Verfügung, die bisher noch nicht voll ausgenutzt wurden. Die spezifische Extraktion von bestimmten Zellsubstanzen wie Lipoiden, RNS und DNS läßt eine quantitative Aufschlüsselung der Zellbestandteile zu [17, 50] und in Verbindung mit der UV-Photometrie können wie in biochemischen Untersuchungen die Nukleinsäuremeßwerte prozentual auf das Trockengewicht bezogen werden.

Diese kurze Übersicht zeigt, daß die heute verfügbaren methodischen Möglichkeiten der quantitativen Histochemie sich speziell auf die Nukleinsäuren und Eiweißkörper in der Zelle konzentrieren.

Untersuchungen über die Nukleinsäureverteilung in Spermien verschiedener Arten liegen schon vom Beginn der histochemischen Area vor. So hat MARCUS [30] schon 1921 die starke UV-Absorption des Kernes menschlicher

Tabelle 1

Zytophotometrische Nachweismethoden (speziell für Spermien)

Substanz	Methode
DNS	Feulgen
DNS + RNS	UV-Photometrie
RNS	UV-Photometrie nach RNase
Histone	Fastgreen pH 8,2 Desaminierung } vermindert (ϵ -Lysin) Azetylierung }
Protamine	Pikrinsäurebromphenolblau Desaminierung } unverändert Azetylierung }
Arginin	Fastgreen pH 8,2 negativ Sakaguchi, MacLeish
Tyrosin	Millon-Reaktion λ 500 m μ
Tyrosin + Tryptophan	/ Millon-Reaktion λ 365 m μ \ UV-Photometrie λ 280 m μ
Tyrosin, Tryptophan, Histidin (NH ₂ ?)	gekuppelte Tetrazonium-Reaktion
Freie basische Gruppen	Fastgreen pH 1,2 Naphthol Yellow S
SS + SH	Barnett, Bahr
α -Glykole	PAS
Trockengewicht	Interferenzmikroskopie Röntgenhistoradiographie <i>Extraktion</i>
Lipoide	Äther-Alkohol
RNS	Ribonuklease
DNS	Desoxyribonuklease, TCS
Rest (Proteine)	

Spermien beschrieben und Voss. 1925 diese Kerne mit der Feulgen-Reaktion dargestellt. Eigene Untersuchungen an menschlichen Spermien (Abb. 1) zeigen die starke Konzentration von Nukleinsäuren, im wesentlichen DNS, im hinteren Teil des Spermienkopfes und ein steiles Konzentrationsgefälle zum Acrosom hin, welches im vorderen Teil kaum noch eine UV-Absorption aufweist. Vakuolen im Acrosom kommen vor, manchmal umgreift das DNS-haltige Material auch den hinteren Teil des Acrosoms manschettenförmig. Mittelstück und Schwanz sind bei der Wellenlänge 265 m μ nur durch Lichtbrechung sichtbar. Absorptionskurven von menschlichen Spermien (s. a. [34])

demonstrieren im Kern (Abb. 2) die Anwesenheit reiner Nucleinsäure (Verhältnis $265/280 = 1,8$), während im hinteren Teil des Acrosoms Nucleinsäuren und tyrosin- und tryptophanhaltige Eiweißkörper vorkommen (Kurvenauswertung bei $\lambda 280 m\mu$). Im vorderen Teil des Acrosoms gleicht die Absorptionskurve etwa der Kurve 5 in Abbildung 2.

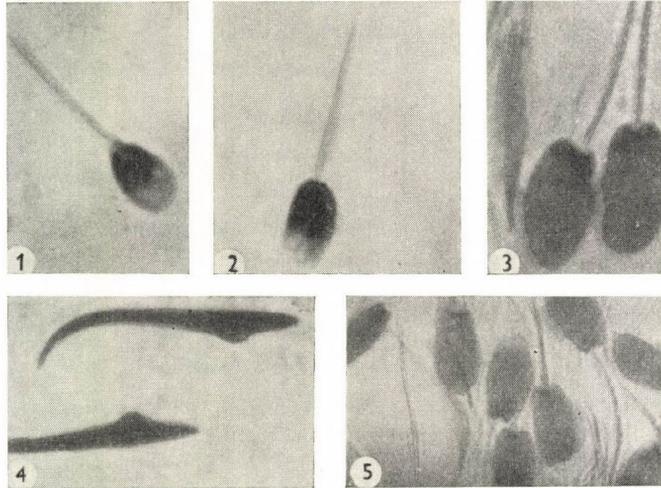


Abb. 1. UV-mikroskopische Aufnahmen bei $\lambda 265 m\mu$ von 1 und 2: Menschliche Spermien, 3: Kaninchenspermien, 4: Rattenspermien, 5: Bullenspermien.

Spermien anderer Mammalier wie Bulle, Kaninchen u. a. zeigen eine ziemlich gleichmäßige Verteilung des UV-absorbierenden Materials im Kopfteil, lediglich im hintersten Teil sehen wir eine Zunahme der Nucleinsäurekonzentration (Abb. 1). Rattenspermien mit den typischen hakenförmigen Köpfen seien noch als weiteres Beispiel erwähnt, wobei das Acrosom hier kaum sichtbar ist.

Über den Nucleinsäuregehalt von Spermien liegen zahlreiche biochemische und quantitativ-histochemische Untersuchungen vor. SWIFT [56]

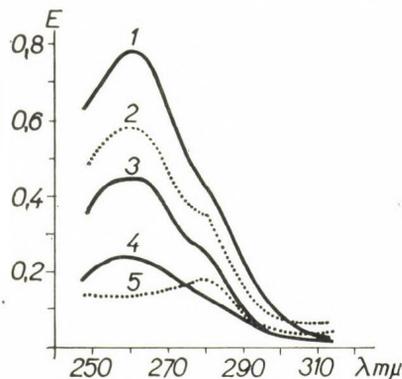


Abb. 2. Erklärung im Text

u. v. a. konnten z. B. bei Heuschrecken und Mäusen nachweisen, daß während der Spermienreifung parallel mit den Reifeteilungen und der Reduktion der Chromosomenzahl der DNS-Gehalt jeweils halbiert wird. Spermatisden mit oktoploidem Chromosomensatz (8 N) zeigten einen Farbstoffgehalt von 12,8 AE, solche mit 4 N (tetraploid) 6,3 AE, 2 N (diploid) 3,16 AE und haploid 1 N Zellen 1,68 AE (s. [39]).

An diesen Beispielen kann besonders eindrucksvoll die Parallelität zwischen dem DNS-Gehalt und der Chromosomenzahl [11, 59] sowie das Gesetz von der DNS-Konstanz demonstriert werden. Biochemische und zytophotometrische Messungen nach Feulgen-Reaktion zeigten an vielen Objekten (Übersicht [59]), daß Spermien die Hälfte des DNS-Gehaltes von diploiden Zellen aufweisen. Auch die eigenen Messungen an Spermien verschiedener Arten mittels der UV-Photometrie (Tab. 2) bestätigen diesen Sachverhalt [43]. Wichtig erscheint in diesem Zusammenhang, daß die UV-Photometrie z. Z. die einzige Methode darstellt, mit der der Nukleinsäuregehalt von einzelnen Spermien in absoluten Mengeneinheiten gemessen werden kann, wobei die gefundenen Mittelwerte mit biochemischen Messungen übereinstimmen. Der mittlere Wert aus einer Zellpopulation täuscht aber eine Konstanz des DNS-Gehaltes vor, die nicht vorhanden ist. Aus unseren Untersuchungen geht vielmehr hervor, daß in allen untersuchten Populationen eine ziemlich große Streuung der Meßwerte vorliegt, die z. B. beim Menschen von $1,8-4,5 \times 10^{-12}$ g [34], (Mittelwert $3,1 \times 10^{-11}$ g) reicht. Liegt bei den Spermien mit abweichendem DNS-Gehalt eine Vermehrung oder Verminderung genetischen Materials vor, oder gibt es eine »Luxus«-DNS, die genetisch inaktiv ist [8]? Theoretisch wäre zu erwarten, daß eine Befruchtung mit einem Spermium mit vermindertem DNS-Gehalt zu schweren Störungen (Mißbildung) bei der Keimentwicklung führt oder sind — wie LEUCHTENBERGER u. Mitarb. [27, 28] nachgewiesen haben — Spermien mit geringerem DNS-Gehalt nicht zur Befruchtung fähig? Diese Autoren fanden, daß bei Infertilität (Mensch, Bulle) nicht nur der DNS-Gehalt der Spermien vermindert ist, sondern auch schon während der Spermatogenese weniger DNS-haltiges Material vorhanden ist. Während primäre Spermatozyten AE von 5,5, sekundäre von 3 und Spermien von 1,5 AE aufweisen, liegen bei infertilen Menschen die entsprechenden Werte bei 2,5, 1,5 + 0,6 AE. Das Verhältnis 4 : 2 : 1 bleibt dabei erhalten. Auch MEYHÖFER (persönliche Mitteilung) fand bei schweren Oligospermien eine Verminderung des DNS-Gehaltes.

Abgesehen von der Nukleinsäureverteilung und dem Gehalt scheinen uns Informationen über den physikalisch-chemischen Zustand der Nukleinsäuren und Proteine in Spermien im Vergleich zu somatischen bzw. funktionell aktiven Zellkernen von größtem Interesse zu sein. Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen von RIS [40] und GIBBONS [23] zeigen, daß in reifen Spermien die 100 Å-dicken DNS-Proteinfibrillen häufig außerordentlich kompakt gelagert sind, sodaß sie elektronenoptisch kaum aufzulösen sind, während bei der Spermienreifung die DNS-Proteinfäden der Zellkerne in vielen Fällen (durch dazwischengelagertes Nichthistonprotein?) in 40 Å-dicken Fibrillen vorliegen. Liegen die DNS-Proteinmoleküle zudem längs der Spermienachse parallel angeordnet, so tritt eine deutliche Doppelbrechung auf [14, 52, 60], die mit der Methode von RUCH [41] auch im UV-Licht gemessen werden kann.

Eigene Untersuchungen mit basischen Farbstoffen lassen ebenfalls darauf schließen, daß die Zusammenlagerung von DNS und Protein in Spermien

Tabelle 2

Ergebnis der ultraviolettmikrospektrophotometrischen Nukleinsäurebestimmungen

Spezies	n	DNS × 10 ⁻¹² g	σ _M	RNS × 10 ⁻¹² g	E 265 mμ	E 280 mμ	E 313 mμ	Verh. 265/280	u ²	Chem. DNS × 10 ⁻¹² g	Chem. RNS × 10 ⁻¹² g
<i>Mensch</i>											
Spermien	35	3,28	±0,086		0,68	0,39	0,02	1,8	10	2,7	—
Spermien (R)	15	3,12	±0,074	0,16	0,66	0,39	0,03	1,69	11	3,4	—
Thymuslym- phozyten	26	7,29	±0,059		0,33	0,19	0,04	1,65	55	6,8 ⁺	—
Thymusl. (R)	34	6,80	±0,24	0,48	0,50	0,32	0,07	1,57	30	—	—
<i>Bulle (Kalb)</i>											
Spermien	29	3,25	±0,091		0,19	0,13	0,02	1,5	39	3,2	—
Thymusl.	21	6,85	±0,11		0,48	0,27	0,04	1,75	33	6,4	—
Thymus (R)	27	6,55	±0,16	0,30	0,47	0,26	0,06	1,79	35	—	0,5
<i>Kaninchen</i>											
Spermien	26	3,25	±0,098		0,27	0,24	0,06	1,4	32	3,1 ⁺	—
Thymusl.	26	5,75	±0,15	—	0,26	0,16	0,02	1,58	50	5,3 ^{-o}	—
										7,2	
<i>Ratte</i>											
Spermien	18	3,11	±0,19	—	0,49	0,30	0,05	0,61	14	—	—
Thymusl.	19	6,05	±0,083	—	0,51	0,32	0,05	1,60	25	7,5*	—
<i>Hahn</i>											
Spermien	24	1,59	±0,045	—	0,34	0,20	0,02	1,70	10	1,26	—
Erythro- zyten	31	3,31	±0,068	—	0,46	0,28	0,04	1,64	15	2,4	—
Ery. (R)	22	3,30	±0,10	0,01	0,50	0,31	0,08	1,62	19	—	0,09
<i>Forelle</i>											
Spermien	24	2,52	±0,074		0,68	0,39	0,02	1,75	8	2,5	—
Erythro- zyten	21	5,61	±0,20	—	0,41	0,32	0,05	1,86	32	4,8—5,3	—
Ery. (R)	21	5,46	±0,23	0,15	0,46	0,34	0,08	1,36	29	—	—
<i>Rana tem- poraria</i>											
Erythro- zyten	22	9,15	±0,33		0,56	0,38	0,05	1,46	37	8—9	—
Ery. (R)	21	8,85	±0,33	0,30	0,56	0,36	0,08	1,54	42	—	—

Spezies	n	DNS × 10 ⁻¹² g	σ _M	RNS × 10 ⁻¹² g	E 265 mμ	E 280 mμ	E 313 mμ	Verh. 265/280	u ²	Chem. DNS × 10 ⁻¹² g	Chem. RNS × 10 ⁻¹² g
<i>Bufo viridis</i>											
Spermien	20	5,43	± 0,18		0,32	0,24	0,02	1,31	37		
Erythro- zyten	23	12,88	± 0,33		0,58	0,37	0,04	1,54	50		
Ery. (R)	23	12,11	± 0,29	0,29	0,58	0,41	0,08	1,40	52		

n = Anzahl der Zellen

(R) = Ribonukleasebehandlung (1 mg/ml) 37°C, 3 Std.

± Wert nach UV-Messungen

° Meßwert für Leber

* Meßwert für Milz

+ Wert für Leukozyten

kompakter ist als in somatischen Zellkernen. Bei zytophotometrischen Messungen des Farbstoffgehaltes von Spermien und polyploiden Zellen nach Gallozyaninchromalaunfärbung vor Ribonukleasebehandlung zeigte sich, daß Spermien weniger Farbstoff binden, als nach dem DNS-Gehalt zu erwarten ist (s. a. [29]). Für diploide bis tetraploide Zellkerne ist allerdings eine gute Parallelität vorhanden (Tab. 3.), die unsere früheren Untersuchungen [18] über

Tabelle 3

Zytophotometrische Messungen des Farbstoffgehaltes nach Gallozyaninchromalaunfärbung und Ribonukleasebehandlung von Spermien und somatischen Zellkernen (Thymus, Leber u. a.)

Zellart	n	Gipfelbildung ΔE			
		haploid	diploid	tetrapl.	oktopl.
<i>Mensch</i>					
Spermien	50	4			
Leber	170		15	30	60
<i>Stier</i>					
Spermien	200	5			
Leber	300		15	30	60
Milz	60		15		
<i>Meerschw.</i>					
Spermien	30	4			
Leber	160		15	30	60

die quantitative Bindung von DNS mit Gallozyaninchromalaun sehr gut unterstützt. Die dichte Packung von DNS und Protein in Spermien wird auch aus weiteren Versuchen an mit NaCl-Lösung behandelten Zellkernen deutlich [25]. Wie Tabelle 4 zeigt, läßt sich in Thymuslymphozytenkernen leicht eine Dissoziation der Phosphatproteinbindungen durch Behandlung mit Salz-

Tabelle 4

Ergebnis der zytophotometrischen Messungen nach Gallozyaninchromalaunfärbung und verschiedener Behandlung von Thymuslymphozyten und Bullenspermien

Kalbthymus	AE
Unbehandelt nativ	8,4
2,5% NaCl	10,3
Alkoholfixation	14,1
<i>Bullenspermien</i>	
Unbehandelt	3,9
5% NaCl	3,7
Trypsin	4,5
Alkoholfixation	5

lösungen oder Fixierung herbeiführen, sodaß der Farbstoff an die DNS angelagert werden kann, während in Spermien selbst eine 5%ige NaCl-Lösung und Trypsinbehandlung keinen Erfolg haben. DNS und Protein sind demnach in Spermien eng miteinander verbunden und schwer dissoziierbar, während in somatischen Zellkernen DNS und Histon leichter getrennt werden können und auch das Nichthistonprotein keine wesentliche Maskierung der Phosphatgruppen herbeiführt, da diploide Zellkerne mit verschiedenem Nichthistonproteingehalt (z. B. Thymuslymphozyten, Leberzellkerne) gleiche Farbstoffmengen binden.

Im Gegensatz zu unseren schon recht weit fortgeschrittenen Kenntnissen über die Nukleinsäuren, ist über die Funktion der Proteine im Zellkern noch

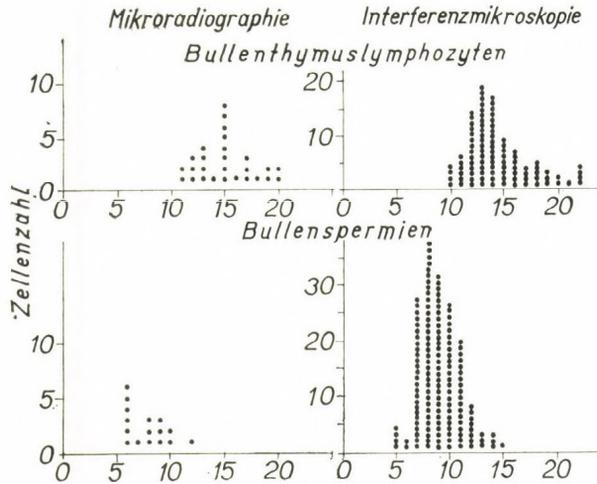


Abb. 3. Gegenüberstellung der Meßwerte des Trockengewichtes nach Röntgenhistoradiographie und Interferenzmikroskopie (in 10^{-12} g)

wenig bekannt. Mehrere Autoren [35, 26, 22, 21, 58, 15 usw.] konnten in biochemischen Arbeiten zeigen, daß bei der Spermienreifung Histoneiweißkörper in Protamine oder protaminähnliche Eiweißkörper (argininreich) umgewandelt werden. Neuere histochemische Arbeiten von ALFERT [1] haben gezeigt, daß primäre und sekundäre Spermatozyten z. B. beim Salm sich mit der Fastgreenfärbung pH 8,2 darstellen lassen (Histoneiweißkörper), während reife Spermien negativ sind (Protamine, die durch die Trichloressigsäure gelöst werden). BLOCH [10] konnte mit der Pikrinsäurebromphenolblau-Reaktion und Blockierung von Lysin ebenfalls die Umwandlung von Histon in argininreiche Eiweißkörper (protaminähnlich) bei *Helix aspera* demonstrieren. Auch die Argininreaktion kann für die Untersuchung von Histon und Protamineiweißkörper herangezogen werden, da Histon nur etwa 15% Arginin, Protamine aber bis zu 90% Arginin enthalten [58].

Die Fastgreenfärbung pH 8,2 kann nach diesen Untersuchungen zur Unterscheidung von Protamin und Histoneiweißkörpern dienen. In somatischen Zellkernen findet man eine bemerkenswerte Stabilität des Farbstoffgehaltes nach Fastgreenfärbung, die — wie die Feulgen-Reaktion — mit den Ploidiestufen der Chromosomen korreliert sein kann [1]. In eigenen Untersuchungen fanden wir, daß sich der Farbstoffgehalt von Spermien zu Thymuslymphozyten wie 1 : 2 verhält, also ähnlich wie nach Feulgen-Reaktion (Tab. 5). Bei Mundschleimhautepithelien wurde allerdings eine verminderte Fastgreenfärbbarkeit gefunden, die nach den Untersuchungen von BLOCH u. Mitarb. [9] auf den hohen Gehalt der Kerne an Nichthistonprotein bezogen werden kann

Tabelle 5

Zytophotometrische Messungen des Feulgen- und Fastgreengehaltes in Spermien und diploiden Zellen

Zellart	Feulgen AE	Fastgreen AE
<i>Stier</i>		
Spermien	6,5	6,8
Thymus	13,2	13,4
<i>Mensch</i>		
Spermien	6,5	6,5
Thymus	13,2	13
Mundschleimhautepithelien	13,5	10,1

Bei jedem Objekt werden 100 Zellen gemessen; für Feulgen mit Filter 574 m μ , für Fastgreen mit Filter 632 m μ

(Blockierung der reaktiven Gruppen). In Tumorzellkernen fanden wir ebenfalls eine veränderte Fastgreenfärbbarkeit [48, s. a. 24]. Diese Beobachtungen sollten Anlaß sein, die Hypothese, daß Proteine (speziell Histone) die Realisation der hereditären Faktoren kontrollierten, näher zu untersuchen. In diesem Zusam-

menhang sind auch die Untersuchungen von LEUCHTENBERGER u. Mitarb. [27, 28] von Interesse, die bei Infertilität einen erhöhten Eiweißgehalt der Spermien beobachten konnten.

Quantitative Aufschlüsse über den Proteingehalt von Spermien können durch Trockengewichtsbestimmungen mit dem Interferenzmikroskop gewonnen werden. Eigene Untersuchungen [48] haben gezeigt, daß bei Zellkernen ohne oder mit nur geringen Mengen von Nichthistonprotein [37] wie Spermien und Thymuslymphozyten oder Erythrozytenkernen die Trockengewichte mit der Chromosomenzahl korreliert sind (haploid zu diploid wie 1 : 2) (s. a. [33]). Tabelle 6 zeigt diese Gegenüberstellung bei verschiedenen Tieren, wobei die Trockengewichtswerte meist sehr gut mit entsprechenden Angaben in der Literatur übereinstimmen. Auch eine Überprüfung der interferenzmikrosko-

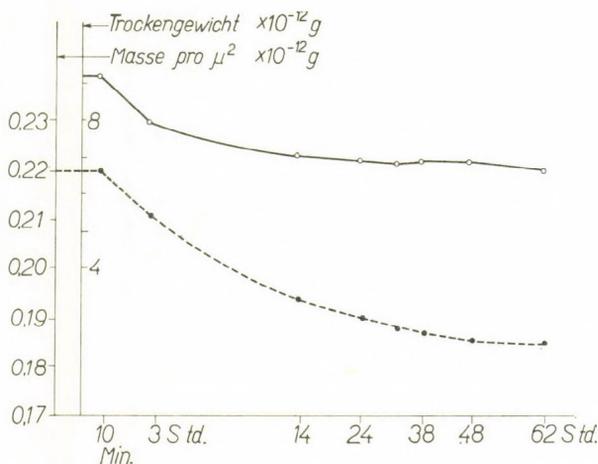


Abb. 4. Trockengewichtsverlust von Bullenspermien in Tyrode-Lösung

pischen Messungen mit der Röntgenhistoradiographie zeigte, daß die Meßwerte nur innerhalb von 10—15% variieren (Abb. 3). Bei Zellen mit höherem Nichthistonproteingehalt, wie Mundschleimhautepithelien, Flimmerepithelien, Alveolarepithelien, Vaginalschleimhautepithelien, liegen allerdings die Kerntrockengewichte höher (zwischen $40-50 \times 10^{-12} \text{ g}$ [49]).

Über die Verteilung des Trockengewichtes und der Masse pro Flächeneinheit in menschlichen Spermien unterrichtet Tabelle 7. Während bei anderen Mammaliern das Trockengewicht ziemlich gleichmäßig über den Kern verteilt ist, sehen wir hier eine um die Hälfte niedrigere Massenkonzentration im Acrosom gegenüber dem Kern. Dementsprechend ist auch das Trockengewicht mit $1,4 \times 10^{-12} \text{ g}$ im Acrosom niedriger als im Kern ($4,7 \times 10^{-12} \text{ g}$).

Die Einbettung der Spermien in Tyrode-Lösung für die interferenzmikroskopischen Messungen läßt erwarten, daß es mit zunehmender Zeit zu einem Verlust niedermolekularer Substanzen und damit zu Trockengewichtsverlusten kommt. Wie Abb. 4 zeigt, haben lebende Spermien ein höheres Trockengewicht und Massenkonzentration (10 Min.) als Spermien, die 3—62 Stunden in gleichem Medium gehalten wurden. Schon nach 3 Stunden ist keine Beweglichkeit mehr festzustellen. In gleicher Weise konnten DAVIES u. Mitarb. [17] zeigen, daß

lebende Widderspermien ein Trockengewicht von $8,9 - 9,6 \times 10^{-12}$ g aufweisen, während für tote Spermien nur ein Gewicht von 7×10^{-12} g gemessen werden konnte.

Für die chemische Zusammensetzung der Zellkerne eröffnen sich mit dem Interferenzmikroskop neue methodische Möglichkeiten, da nach spezifischer Extraktion jeweils an der gleichen Zelle Trockengewichtsmessungen ausgeführt werden können (vgl. [17, 51]). Abbildung 5 zeigt einen solchen typischen Versuch, wobei nach Alkohol-Äther-Extraktion bei Bullenspermien eine Trockengewichtsabnahme um 10% ($0,7 \times 10^{-12}$ g), nach Ribonukleasebehandlung um 5% ($0,3 \times 10^{-12}$ g) und nach Trichloressigsäure-Extraktion um 40% ($3,5 \times 10^{-12}$ g) festgestellt wurde. Der verbleibende Rest kann als

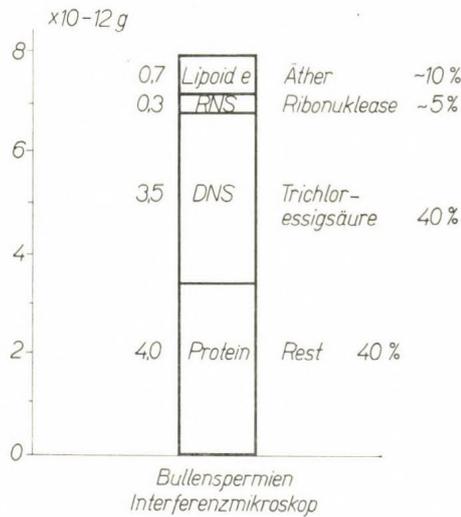


Abb. 5. Typisches Beispiel für die Substanzextraktion mit dem Interferenzmikroskop

Protein (Histoneiweißkörper) angesprochen werden. Der auf diese Weise erhaltene DNS-Wert von $3,5 \times 10^{-12}$ g stimmt gut mit uv-photometrischen Messungen überein. DAVIES u. Mitarb. [17] haben in ähnlicher Weise an Widderspermien einen Lipidgehalt von 12% gefunden und einen DNS-Gehalt von $2,8 \times 10^{-12}$ g (chemische Bestimmungen $3,4 \times 10^{-12}$ g).

In Verbindung mit der UV-Photometrie, mit der der Nukleinsäuregehalt von Zellobjekten quantitativ bestimmt werden kann, läßt sich nach Trockengewichtsbestimmungen ebenfalls der Gehalt an Restsubstanzen (im wesentlichen Proteine) mit dem Interferenzmikroskop messen. Tabelle 6 zeigt, daß nach Abzug des Nukleinsäuregehaltes vom Trockengewicht der Gehalt an Restsubstanzen (Protein) bei den meisten Spermien 40–50% beträgt. Diese Untersuchungen zeigen also, daß in Spermien Nukleinsäuren und Proteine meistens in einem gewissen Verhältnis von 1 : 1 vorliegen und 90% oder mehr der Spermienmasse ausmachen.

Die letzten Beispiele zeigen deutlich, wie mit mehreren unabhängigen quantitativen histochemischen Methoden die Meßergebnisse überprüft werden können und die Methoden sich gegenseitig ergänzen.

Tabelle 6
*Zusammenfassende Darstellung der Trockengewichtsbestimmungen
an haploiden und diploiden Zellkernen*

Spezies und Zellart	n	Konz. $\times 10^{-12}$ g/ μ^2	Trockengew. $\times 10^{-12}$ g	DNS ⁺ $\times 10^{-12}$ g	% DNS
<i>Mensch</i>					
Spermien	47		6,23	3,1	50
Thymuslymphozyten	115	0,524	13,73	6,8	49
<i>Stier</i>					
Spermien	175	0,219	8,88	3,2	40
Thymuslymphozyten	96	0,558	14,40	6,5	45
<i>Kaninchen</i>					
Spermien	44	0,222	6,75	3,2	48
Thymuslymphozyten	28	0,467	13,28	5,7	43
<i>Ratte</i>					
Spermien	41	0,331	6,04	3,1	51
Thymuslymphozyten	75	0,468	11,24	6,1	55
<i>Meerschweinchen</i>					
Spermien	25	0,254	8,21	3°	38
<i>Maus</i>					
Spermien	24	0,619	8,58	3*	38
<i>Hahn</i>					
Spermien	44	0,218	2,49	1,5	60
Erythrozyten	98	0,409	5,24	3,3	64
<i>Forelle</i>					
Spermien	63	0,576	4,24	2,5	63
Erythrozyten	34	0,326	8,36	5,4	63

° Haploider Wert nach VENDRELY 1955.

* Haploider Wert nach DAVIES u. Mitarb. 1957.

+ DNS-Werte nach eigenen Messungen (SANDRITTER u. Mitarb. 1960).

Tabelle 7
Interferenzmikroskopische Trockengewichtsbestimmungen an menschlichen Spermien

	μ^2	$g/\mu^2 \times 10^{-12}$	Trockengewicht $\times 10^{-12}$ g
Ganzes Spermium	14,1		6,0
Kern	8,2	0,57	4,7
Acrosom	5,9	0,23	1,4

LITERATUR

1. ALFERT, M. (1956), Chemical differentiation of nuclear proteins during spermatogenesis in the salmon. *J. biophys. biochem. Cytol.*, **2**, 109—114.
2. ALFERT, M. (1959), Cytochemische Untersuchungen an basischen Kernproteinen während der Gametenbildung, Befruchtung und Entwicklung. 9. Kolloquium Gesellsch. Physiol. Chemie 1958 »Chemie der Genetik«. 73—84. Springer Verlag, Berlin.
3. ALFERT, M., GESCHWIND, I. I. (1953), A selective staining method for the basic proteins of cell nuclei. *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, **39**, 991—999.
4. AVERY, O. T., MACLEOD, C. M., MCCARTY, M. (1944), Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. *J. exp. Med.*, **79**, 137—157.
5. BAHR, G. F. (1957), Changes in liver cell elements during stimulated protein synthesis. *Acta radiol. (Stockh.)*, Suppl., **147**.
6. BARNETT, R. J., SELIGMAN, A. M. (1954), Histochemical demonstration of sulfhydryl and disulfide groups of protein. *J. nat. Cancer Inst.*, **14**, 769—792.
7. BENEŠ, K., SANDRITTER, W. (1960), Versuche zur quantitativen histophotometrischen Proteinbestimmung mit der Tetrazonium-Kupplungs-Reaktion nach Burstone. *Histochemie*, **2**, 32—42.
8. BENZER, S. (1957), The elementary units of heredity. In *The chemical basis of heredity*. John Hopkins Press, Baltimore.
9. BLOCH, D. P., GODMAN, G. C. (1955), Evidence of differences in the desoxyribonucleo-protein complex of rapidly proliferating and non dividing cells. *J. biophys. biochem. Cytol.*, **1**, 531—550.
10. BLOCH, D. P., HEW, H. Y. C. (1958), Schedule of spermatogenesis in the pulmonate snail, *Helix aspersa*, with special reference to histone transition. *J. biophys. biochem. Cytol.*, **7**, 515—531.
11. BOIVIN, A., VENDRELY, C., VENDRELY, R. (1948), L'acide désoxyribonucléique du noyau cellulaire dépositaire des caractères héréditaires, arguments d'ordre analytique. *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, **226**, 1061—1063.
12. BURSTONE, M. S. (1955), An evaluation of histochemical methods for protein groups. *J. Histochem. Cytochem.*, **3**, 32—49.
13. CASPERSSON, T. (1936), Über den chemischen Aufbau der Strukturen des Zellkernes. *Skand. Arch. Physiol.*, **73**, Suppl. 8.
14. CASPERSSON, T. (1940), Nukleinsäureketten und Genvermehrung. *Chromosoma (Berl.)*, **1**, 605—619.
15. DALY, M. M., MIRSKY, A. E., RIS, H. (1951), The amino acid composition and some properties of histones. *J. gen. Physiol.*, **34**, 439—450.
16. DANIELLI, J. F. (1949), Studies on the cytochemistry of proteins. *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.*, **14**, 32—39.
17. DAVIES, H. G., DEELY, E. M., DENBY, E. F. (1957), Attempts at measurement of lipid, nucleic acid and protein content of cell nuclei by microscope-interferometry. *Exp. Cell Res., Suppl.*, **4**, 136—149.
18. DIEFENBACH, H., SANDRITTER, W. (1954), Die quantitative Bindung von Gallocyaninchromalaun an Desoxyribonukleinsäure. *Acta histochem. (Jena)*, **1**, 55—59.
19. DYSON, J. (1950), An interferometer microscope. *Proc. roy. Soc. A.*, **204**, 170—187.
20. ENGSTRÖM, A. (1956), Historadiographie. In *Physical Techniques in Biological Res.*, **3**, 489—543. Academic Press, N. Y.
21. FELIX, K., FISCHER, H., KREKELS, A. (1956), Protamines and nucleoprotamines. *Progr. Biophys.*, **6**, 2—23.
22. FISCHER, H., KREUZER, L. (1953), Über Gallin. *Z. physiol. Chem.*, **293**, 176—182.
23. GIBBONS, I. R., BRADFIELD, J. R. G. (1957), The fine structure of nuclei during sperm maturation in the locust. *J. biophys. biochem. Cytol.*, **3**, 133—140.
24. GRUNDMANN, E. (1960), Zur Zytogenese des Portiocarcinoms nach zytphotometrischen Untersuchungen. *Verh. dtsh. Ges. Path.* **44**, Tgg., 261—266.
25. JOBST, K., SANDRITTER, W. (1961), Über die Beeinflussung der Farbbindung von Toluidinblau und Gallocyaninchromalaun mit Nucleoproteiden. *Acta histochem. (Jena)*, **11**, 276—283.
26. KOSSEL, A. (1929), Protamine und Histone. F. Deuticke, Leipzig.
27. LEUCHTENBERGER, C., LEUCHTENBERGER, R. (1958), Die Desoxyribonucleoproteide im Säugetiersperma: Eine quantitative Studie an menschlichen und Stierspermatozoen mittels Mikrospektrophotometrie und Interferenzmikroskopie. *Z. Physiol. Chem.*, **313**, 130—137.

28. LEUCHTENBERGER, C., MURMANNIS, I., MURMANNIS, L., ITO, S., WEIR, D. R. (1956), Interferometric dry mass and microspectrophotometric arginine determinations on bull sperm nuclei with normal and abnormal DNA content. *Chromosoma (Berl.)*, **8**, 73—86.
29. LISON, L. (1955), Variation de la basophilie pendant la maturation du spermatozoïde chez le rat et sa signification histochemique. *Acta histochem. (Jena)*, **2**, 47—67.
30. MARCUS, H. (1921), Über die Struktur des menschlichen Spermiums. *Arch. Zellforsch.*, **15**, 445—448.
31. MAZIA, F., BREWER, P. A., ALFERT, M. (1953), The cytochemical staining and measurement of protein with mercuric bromphenol blue. *Biol. Bull.*, **104**, 57—67.
32. MCLEISH, J., BELL, L. G. E., LA COUR, L. F., CHAYEN, J. (1957), The quantitative cytochemical estimation of arginine. *Exp. Cell Res.*, **12**, 120—125.
33. MELLORS, R. C., HLINKA, J. (1955), Quantitative cytology and cytopathology, IV. Interferometric measurement of the anhydrous organic mass (dry weight) of genetic material in sperm nuclei of the mouse, the rat and the guinea pig. *Exp. Cell Res.*, **9**, 128—134.
34. MEYHÖFER, W., HERRMANN, R., KNOTH, W. (1960), Über Ultraviolett-Absorptions-Messungen an Spermatozoen. *Arch. klin. exp. Derm.*, **209**, 637—642.
35. MIESCHER, F. (1897), Die histochemischen und physiologischen Arbeiten. Leipzig.
36. MIRSKY, A. E., RIS, H. (1949), Variable and constant components of chromosomes. *Nature (Lond.)*, **163**, 666—667.
37. MIRSKY, A. E., RIS, H. (1951), The composition and structure of isolated chromosomes. *J. gen. Physiol.*, **34**, 475—492.
38. MÜLLER, D., SANDRITTER, W., SCHIEMER, H. G., ENDRES, K. (1959), Röntgen-historadiographische und interferenzmikroskopische Trockengewichtsbestimmungen an Zellausstrichen. *Histochemie*, **1**, 438—444.
39. POLLISTER, A. W., SWIFT, H., ALFERT, M. (1951), Studies on the desoxyribose nucleic acid content of animal nuclei. *J. cell. comp. Physiol.*, **38**, Suppl. 1, 101—119.
40. RIS, H. (1959), Die Feinstruktur des Kerns während der Spermio-genese. 9. Colloquium Ges. Physiol. Chem. Mosbach 1958, Springer Verlag, Heidelberg.
41. RUCH, F. (1956), Birefringence and dichroism of cells and tissues. In *Physical Techniques in Biological Res.* **3**, 149—174., Academic Press, N. Y.
42. SANDRITTER, W. (1957), Das ultraviolette Absorptionsspektrum der Proteine: Mikrospektrophotometrische Methodik. *Acta histochem. (Jena)*, **4**, 276—303.
43. SANDRITTER, W. (1958), Ultraviolett-mikrospektrophotometrie. Im Hdb. der Histochemie, 220—338. Stuttgart.
44. SANDRITTER, W., KRYGIER, A. (1959), Cytophotometrische Bestimmungen von proteingebundenen Thiolen in der Mitose und Interphase von HeLa-Zellen. *Z. Krebsforsch.*, **62**, 596—610.
45. SANDRITTER, W., MÜLLER, D. (1959), Vergleichende röntgenhistoradiographische und interferenzmikroskopische Trockengewichtsbestimmungen. *Experientia (Basel)*, **15**, 158—161.
46. SANDRITTER, W., MÜLLER, D., SCHIEMER, H. G. (1958), Über den Nukleinsäuregehalt und das Trockengewicht in haploiden und diploiden Zellen. *Anat. Anz.*, **105**, 146—156.
47. SANDRITTER, W., PILLAT, G., THEISS, E. (1957), Zur Wirkung der Ribonuklease auf Leberzellen. *Exp. Cell Res. Suppl.*, **4**, 64—82.
48. SANDRITTER, W., SCHIEMER, H. G. (1958), Histochemie an HeLa-Zellen. *Verh. dtsch. Ges. Path.* 449—458. Stuttgart.
49. SANDRITTER, W., SCHIEMER, H. G., ALT, W. (1960), Das Interferenzmikroskop im Dienste der Cytologie und Krebsforschung. *Klin. Wschr.*, **12**, 590—595.
50. SCHIEMER, H. G. (1961), Das Interferenzmikroskop zum Nachweis von Fermenten und anderen Substanzen in der Histochemie. *Acta histochem. (Jena)*, Suppl. **2**, 110—122.
51. SCHIEMER, H. G., ALT, W., SANDRITTER, W. (1957), Zur Methodik der Trockengewichtsbestimmungen mit dem Bakerschen Interferenzmikroskop. *Acta histochem. (Jena)*, **4**, 325—360.
52. SCHMIDT, W. J. (1937), Protoplasmamographie, **11**, Bornträger, Berlin.
53. SCHRADER, F., LEUCHTENBERGER, C. (1950), The cytology and chemical nature of some constituents of the developing sperm. *Chromosoma (Berl.)*, **4**, 404—428.
54. SMITH, F. H. (1955), Microscope interferometry. *Research*, **8**, 385—395.
55. STEDMAN, E., STEDMAN, E. (1943), Probable function of histone as a regulator of mitosis. *Nature (Lond.)*, **152**, 556—557.

56. SWIFT, H. (1953), Quantitative aspects of nuclear nucleoproteins. *Int. Rev. Cytol.*, **2**, 1—69. Academic Press, N. Y.
57. TEIGER, D. G., FARAH, A., DiSTEFANO, H. S. (1957), Cytophotometric determination of protein-bound disulfid groups. *J. Histochem. Cytochem.*, **5**, 403—407.
58. VENDRELY, C., KNOBLOCH, A., VENDRELY, R. (1956), Contribution à l'étude biochimique comparée de diverses désoxyribonucléoprotéines d'origine animale. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)*, **19**, 472—479.
59. VENDRELY, R. (1955), The desoxyribonucleic acid content of the nucleus. In *The Nucleic Acids*, II, 155—176. Academic Press, N. Y.
60. WILKINS, M. H. F., RANDALL, J. T. (1953), Crystallinity in sperm heads: molecular structure of nucleoprotein in vivo. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)*, **10**, 192—193.

ÜBER DIE ZUSAMMENHÄNGE ZWISCHEN DEN BEWERTUNGSFAKTOREN DES BULLENSAMENS UND DER BEFRUCHTUNG

J. BECZE

FORSCHUNGSINSTITUT FÜR TIERZUCHT, BUDAPEST

Zusammenfassung

Auf Grund der Angaben der von 10 Bullen im Verlauf eines Jahres produzierten 1479 Ejakulate und der Befruchtungen von 12 752 Kühen wurde mit Hilfe der *Regressionswerte* untersucht, welche graduelle Abweichungen der den einzelnen Samenbewertungsfaktoren entsprechenden Veränderungen in der Befruchtung eintreten. Es wurden folgende Regressionskoeffizientenwerte ermittelt: Massenbewegung 1,750, Dichte 3,115, prozentuale Bewertung der lebenden Zellen 0,039, Redoxprobe 1,420, Bewegungsqualität 1,025, Gesamtauswertung 0,195.

Der auf die Dichte bezügliche Zusammenhang läßt sich auf das Samenentnahmeverfahren zurückführen; vor der Samenentnahme läßt man das Sekret der akzessorischen Geschlechtsdrüsen gesondert hinausschießen.

Danach liegt der größte Zusammenhang zwischen der Massenbewegung und der Fertilität vor. Die Qualität der bei der Samenentnahme rasch bewertbaren Massenbewegung gibt somit einen ausreichenden Anhaltspunkt für die Befruchtungsfähigkeit des Samens, so daß sich die Durchführung komplizierter biologischer Proben zu diesem Zweck erübrigt.

Man ist seit langem bestrebt, eine Bewertung des Bullensamens zu finden, aus der zuverlässige Schlußfolgerungen auf die Befruchtungsfähigkeit gezogen werden können. Das Problem ist ziemlich schwierig, weil das Ergebnis, das Ausmaß der Befruchtung der weiblichen Tiere, auf den Resultanten vieler Faktoren beruht. Aus diesem Grunde sind auch oft widersprechende Literaturangaben anzutreffen.

Wir haben Untersuchungen durchgeführt, um festzustellen, ob unter den einheimischen Verhältnissen ein Zusammenhang zwischen den einzelnen Samenbewertungsfaktoren und der Befruchtung besteht.

Die Angaben beziehen sich auf die im Verlauf eines Jahres produzierten 1479 Ejakulate von 10 Bullen und auf die Befruchtung von 12 752 Kühen. Wir haben ein ganzes Jahr berücksichtigt, damit die Ergebnisse durch den Einfluß der jahreszeitlichen Schwankungen nicht beeinträchtigt werden.

Bei der Samenentnahme wurde folgendes bewertet: Die *Spermamenge* in ml, die *Konzentration* auf Grund subjektiver Beurteilung in fünf Abstufungen, die *Massenbewegung*, gleichfalls subjektiv beurteilt in fünf Abstufungen (Beurteilung der von der Samendichte und individuellen Bewegung der Samenfäden abhängigen charakteristischen Bewegung), die *prozentuale Bewertung der lebenden Zellen*, ebenfalls subjektiv, das *Resultat der Redoxprobe*, die *Qualität der Bewegung* auf Grund subjektiver Bewertung der individuellen Bewegung der Spermien in fünf Abstufungen und die sog. *Gesamtauswertung*, die dem unter Berücksichtigung sämtlicher Beurteilungsfaktoren entstandenen Gesamteindruck entspricht, ebenfalls in fünf Abstufungen.

Bei den Untersuchungen interessierte uns hauptsächlich, ob die Abweichungen im Befruchtungsprozentsatz den graduellen Abweichungen der einzelnen Samenbewertungsfaktoren entsprechend zutage treten. Aus diesem Grunde führten wir Regressionsberechnungen durch.

Die Regressionskoeffizienten zeigen folgenden Zusammenhang:

Hinsichtlich der Dichte	a = 3,115
Hinsichtlich der Massenbewegung	a = 1,750
Prozentualer Wert der lebenden Zellen.....	a = 0,039
In bezug auf die Bewegungsqualität	a = 1,023
In bezug auf die Gesamtauswertung	a = 0,195

Wie ersichtlich, besteht der auffallendste Zusammenhang in bezug auf die *Dichte*, dann folgt die *Massenbewegung*. Dieser auf die Dichte bezügliche Zusammenhang läßt sich mit der Samenentnahmetechnik erklären; vor der Spermaentnahme läßt man einen großen Teil des Sekrets der akzessorischen Geschlechtsdrüsen gesondert hinausschießen, wodurch ein konzentrierterer

Tabelle 1

Die Regressionswerte von vier Bewertungsfaktoren der drei Bullen

(n = Zahl der Fälle; a = Regressionskoeffizient)

		I	II	III
Bewegungsqualität	n	125	143	141
	a	-2,12	-1,56	-1,8
Dichte	n	122	143	138
	a	2,89	-3,73	-8,12
Massenbewegung	n	120	142	141
	a	0,73	-3,06	-3,00
Gesamtauswertung	n	117	139	135
	a	0,99	-4,40	4,35

Samen gewonnen werden kann. Die *Massenbewegung* gibt demnach als eine die Samenqualität anzeigende Eigenschaft den zuverlässigsten Anhaltspunkt für die Befruchtungsfähigkeit des Spermas.

Um die gewonnenen Angaben mit ausreichender Sicherheit bewerten und feststellen zu können, inwieweit diese Zusammenhänge bei der Beurteilung der einzelnen Bullen verwertbar sind, haben wir 3 Tiere ausgewählt: einen Bullen mit gutem Befruchtungsprozentsatz (I = 64,15%), einen mit mittelmäßigem (II = 56,73%) und einen mit niedrigem (III = 51,37%). Die Regressionswerte der vier wichtigsten Bewertungsfaktoren (Bewegungsqualität, Dichte, Massenbewegung, Gesamtauswertung) dieser Bullen wurden gesondert errechnet. Bei denselben 3 Bullen untersuchten wir auch das Ausmaß der Streuung bei der »Gesamtauswertung«, der wichtigsten und zusammenfassenden Bewertung. Die Regressionskoeffizienten sind in Tabelle 1, die Mittelwerte und

Tabelle 2
Streuungswerte bei der »Gesamtauswertung« der drei Bullen

			$\frac{3}{5}$	$\frac{4}{5}$	$\frac{5}{5}$	Insgesamt
I. Bulle	Zahl d. Fälle	(n)	2	65	46	113
	Mittelwert	(x)	75,00	62,82	61,90	63,71
	Streuung	(s)	25,00	25,49	20,86	23,70
II. Bulle	Zahl d. Fälle	(n)	8	101	18	127
	Mittelwert	(x)	70,52	63,78	53,24	62,81
	Streuung	(s)	17,86	22,26	14,07	21,34
III. Bulle	Zahl d. Fälle	(n)	6	108	6	120
	Mittelwert	(x)	50,92	55,42	55,28	55,19
	Streuung	(s)	26,63	24,00	11,60	23,54

Streuungswerte in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Für die von 10 Bullen im Verlauf eines Jahres produzierten 1479 Ejakulate und die Befruchtung der zugehörigen 12 752 Kühe gültigen Zusammenhänge können somit — auf einzelne Bullen bezogen — nicht festgestellt werden.

Die Streuung der »Gesamtauswertung« aber zeigt, daß eine größere Streuung zwischen den Qualitätsabstufungen ($\frac{3}{5}$, $\frac{4}{5}$, $\frac{5}{5}$) als zwischen den Bullen besteht (zwischen den Bullen 23,70%, 21,34%, 23,54%, zwischen den Abstufungen z. B. bei II = 17,86, 22,26, 14,07).

Besprechung

Wie aus den Resultaten hervorgeht, zeigen die Regressionswerte nur bei hohen Zahlen eine gewisse Tendenz, bei niedrigen (bei 1 Bullen in 1 Jahr etwa 110 Ejakulate und etwa 1400 befruchtete Kühe) schon nicht mehr.

Die Zusammenhänge lassen sich schwer ermitteln, was hauptsächlich darauf zurückzuführen ist, daß die Skala der Qualifikationsabstufungen ebenso wie die Abweichungen zwischen den Abstufungen verhältnismäßig klein sind. Aus diesem Grunde können auch positive und negative Zusammenhänge vorkommen. Es lohnt sich daher nicht, der Frage, ob der Samen den Wert $\frac{5}{M}$ oder $\frac{4}{M}$ zeigt, allzu große Bedeutung beizumessen (da ja auch die subjektive Beurteilung eine derartige Abweichung verursachen kann). Wenn z. B. auch ein schlechter beurteiltes Ejakulat als die übliche Qualität $\frac{3}{M}$ zur Anwendung käme und daher unter den zur Befruchtung benutzten Samen auch die Qualität $\frac{1}{M}$ bewertet werden könnte, so würde sich die Wirkung von $\frac{5}{M}$ von diesem bereits erheblich leichter bewertbar unterscheiden.

In bezug auf die einzelnen Bewertungsfaktoren sind die Schwankungen bei den verschiedenen Bullen im allgemeinen geringer als die Schwankungen zwischen den Bullen, woraus folgt, daß es überflüssig ist, den Abweichungen zwischen den Bewertungsfaktoren übertriebene Bedeutung beizulegen, weil auch die Feststellung der Grenzwerte genügt. Es erübrigt sich, auf diesem Wege weiterzugehen, dieses Verfahren noch feiner zu gestalten, weil dies nur zu einer formalistisch-äußerlichen Beurteilung des Samens führen würde.

HISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN DER SPERMIOGENESE

Z. PÓBALAKY

MORPHOLOGISCHE ABTEILUNG, INSTITUT FÜR EXPERIMENTELLE MEDIZIN
DER UNGARISCHEN AKADEMIE DER WISSENSCHAFTEN, BUDAPEST

Zusammenfassung

Die Enzymaktivität der Spermio-genese der Ratte wurde mit histochemischen Methoden untersucht. Die Ergebnisse zeigten, daß eine Aktivität der Enzyme, die in der Glykolyse sowie im Szent-Györgyi—Krebs-Zyklus eine Rolle spielen, nachweisbar ist. Intensive Aktivität konnte in den jugendlichen, sog. ruhenden Spermiozyten und während der Differenzierung der Spermien in den Sertolischen Zellen in den desquamierenden Plasmateilen festgestellt werden.

Der Mechanismus und die Stoffwechselverhältnisse der Spermio-genese lassen sich nur mit histochemischen Methoden untersuchen. Das Dehydrogenase-Enzymsystem ist eines derjenigen, für deren histochemische Untersuchung genügend zuverlässige Methoden in den auf der Reduktion von Tetrazoliumsalsen beruhenden Verfahren zur Verfügung stehen.

Material und Methode

Unsere Untersuchungen haben wir an Rattenhoden vorgenommen. Die 10—20 Mikron dicken Schnitte wurden im Kryostaten hergestellt und sogleich teils in Neotetrazol (NT), teils in MTT nach PEARSE bzw. Nitro-BT enthaltender Lösung inkubiert. Folgende Enzyme wurden histochemisch untersucht: Sukzinodehydrogenase, TPN-, DPN-Diaphorase, Alkohol-, Glykose-6-phosphat-, α -Glyzerophosphat- und Laktatdehydrogenase [2]

Ergebnisse

Die Entwicklung der Spermien besprechen wir in 8 Stadien [1, 3].

Abb. 1: Rattenhodenkanalabschnitt, mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Man sieht vier Keimepithelschichten: Die primären, ruhenden, die in sekundärer, meiotischer Prophase befindlichen Spermiozyten und die Spermiden, die zwischen den Sertolischen oder Stützzellen anwesend sind. Im Verlauf einer spermio-genetischen Welle wandeln sich die Spermiden zu Spermien um, wobei sich sämtliche Schichten weiterentwickeln. Dies ist somit als der Anfang, als das erste Stadium der Spermio-genese zu betrachten.

Abb. 2: Sie zeigt (ebenfalls in einer H.-E.-Färbung) das folgende, zweite Stadium der Entwicklung, das sich vom vorigen insofern unterscheidet, als der Umwandlungsprozeß der Spermiden zu Spermien begonnen hat. Den Sertolischen Zellen entsprechend fangen sie an, sich in Gruppen zu ordnen. Die anderen Schichten bleiben unverändert, d. h. die primären Spermiozyten befinden sich in früher Prophase, die sekundären Spermiozyten in später Prophase.

Abb. 3: Drittes Stadium der Spermiogenese (H.-E.), in dem der Kern der in Bündeln angeordneten Spermiden bereits verlängert ist und die für den Spermiumkopf charakteristische Form anzunehmen beginnt. Die übrigen Schichten sind unverändert.

In den besprochenen frühen Entwicklungsstadien zeigen die Sukzino-, Laktatdehydrogenase und die TPN-Diaphorase entsprechend der Reihe der primären, in früher Prophase befindlichen Spermiozyten eine starke Reaktion.

Abb. 4: Für das dritte Stadium charakteristische Sukzinodehydrogenase-Reaktion (NT), die aber auch für die ersten beiden Stadien kennzeichnend ist. Der Reihe der primären, in früher Prophase befindlichen sog. ruhenden Spermiozyten entsprechend sieht man eine stark positive Reaktion. In diesen Zellen lösen sich infolge des Lipidgehalts die Neotetrazol-Formazan-Kristalle auf, weshalb die intrazelluläre Lokalisation nicht genau untersucht werden kann. In den in meiotischer Prophase befindlichen sekundären Spermiozyten ist keine Reaktion zu sehen. Die Spermiden, deren Umgestaltung begonnen hat, zeigen feinkörnige, aber sich verstärkende Reaktion.

Abb. 5: Laktatdehydrogenase-Reaktion (MTT-Methode). Es ist deutlich zu sehen, daß die Reaktion in den primären Spermiozyten am stärksten ist, doch kann man bei diesem Enzym ebenso wie bei der DPN-Diaphorase auch in den sekundären Spermiozyten Enzymaktivität feststellen.

Abb. 6: Ein für das vierte Stadium der Entwicklung bezeichnendes Bild (mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt). Die in Umwandlung begriffenen Spermiden beginnen, in Gruppen angeordnet, in die Sertolischen Zellen einzudringen. In diesem Stadium geht die Reifungsteilung der sekundären Spermiozyten vor sich, als deren Resultat am Ende dieses Stadiums die neue Schicht der Spermiden entsteht.

Am Ende des vierten Stadiums treten die primären Spermiozyten nach Abschluß der Reifungsteilungen in das Spätstadium der meiotischen Prophase. Zu gleicher Zeit hört die am Basalabschnitt bisher festgestellte starke Enzymaktivität auf, die sich indessen zum gleichen Zeitpunkt im Plasma der in Umwandlung befindlichen Spermiden zu verstärken beginnt.

Im vierten Stadium nimmt die Intensität der Sukzinodehydrogenase-Reaktion am basalen Abschnitt ab, in den sich umwandelnden Spermiden dagegen zu. Dasselbe sieht man bei der TPN-Diaphorase, α -Glycerophosphat- und Laktatdehydrogenase.

Abb. 7: Fünftes Stadium der Entwicklung der Spermien (H.-E.), in dem die Spermien in die Sertolischen Zellen einzudringen beginnen, sich die Schicht der neuen Spermiden bildet, und auch die neue Schicht der sekundären Spermiozyten entsteht.

Abb. 8: Sechstes Stadium (H.-E.), wo die Spermien in der Tiefe der Sertolischen Zellen anzutreffen sind. Zu diesem Zeitpunkt teilen sich die Spermatogonien und bringen die neue Schicht der primären Spermiozyten zustande.

Vom fünften Stadium an verstärkt sich in den abgelösten Plasmateilen die Aktivität sämtlicher Enzyme.

Abb. 9: Für das sechste Entwicklungsstadium bezeichnende α -Glycerophosphat-Reaktion, MTT-Methode. Die Reaktion ist dem Mittelstück des entstehenden Spermiums entsprechend stark.

Abb. 10: Achstes Stadium, in dem sich die vollentwickelten Spermien bereits aus den Sertolischen Zellen zurückgezogen haben und gerade zum Lumen hin desquamieren. Hämatoxylin-Eosinfärbung. Man sieht wieder die

primären und sekundären Spermiozyten und die Spermidenschicht. Der in der Abbildung sichtbare andere Kanal veranschaulicht bereits das erste Stadium nach Ablösung der Spermien, den Beginn der neuen spermiogenetischen Welle.

Bis zum achten Stadium nimmt die Aktivität fast aller Enzyme in den desquamierenden Plasmateilen zu.

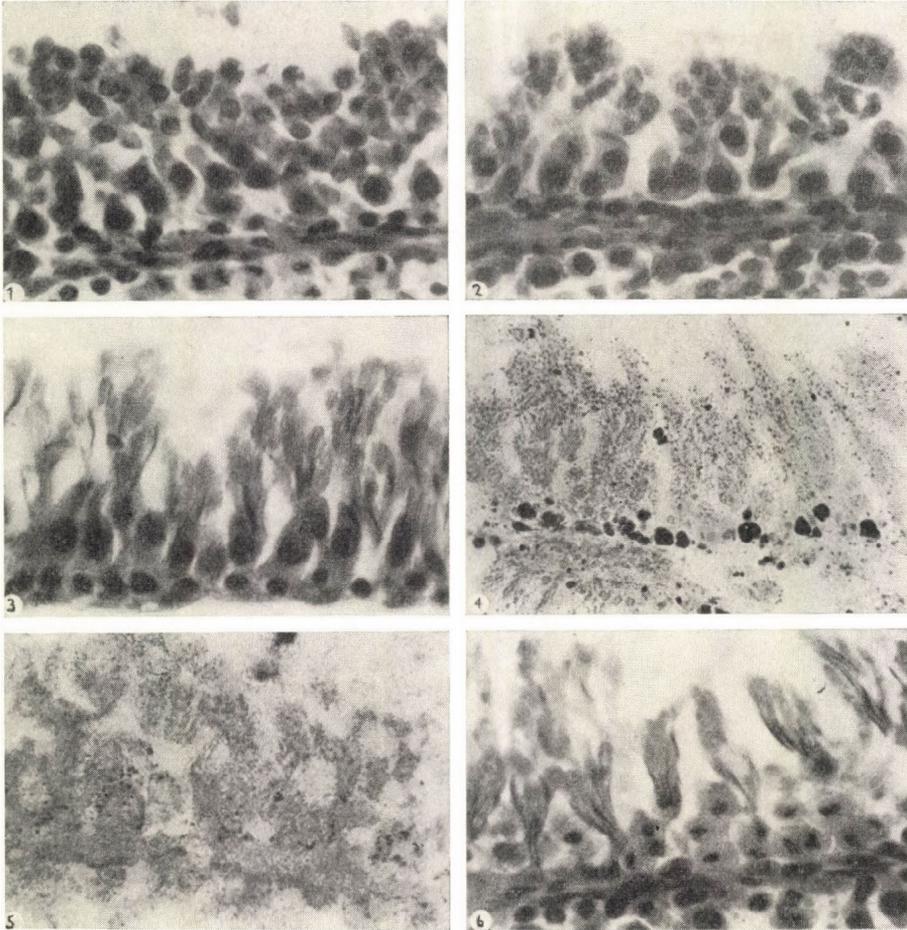


Abb. 1-6. Erklärung im Text

Abb. 11: Dem siebenten bzw. achten Stadium entsprechende Laktatdehydrogenase-Reaktion, MTT-Methode. Zwischen den Spermien, in den desquamierten Plasmateilen, ist die Enzymaktivität sehr stark, im Mittelstück des Spermiums hingegen sehr schwach.

In den Mitochondrien des Mittelstücks der entstehenden Spermien ist bereits vom sechsten Stadium an ständig zunehmende DPN-Diaphorase-, Alkohol- und α -Glyzerophosphatdehydrogenase-Aktivität festzustellen.

In den interstitiellen Zellen zeigten sämtliche untersuchten Enzyme intensive Reaktion.

Besprechung

Da wir die biochemische Rolle der untersuchten Enzyme kennen, geben die Resultate eine gewisse Auskunft über die Intensität der in der Spermio-genese vor sich gehenden Stoffwechselprozesse, so über die Funktion des Szent-

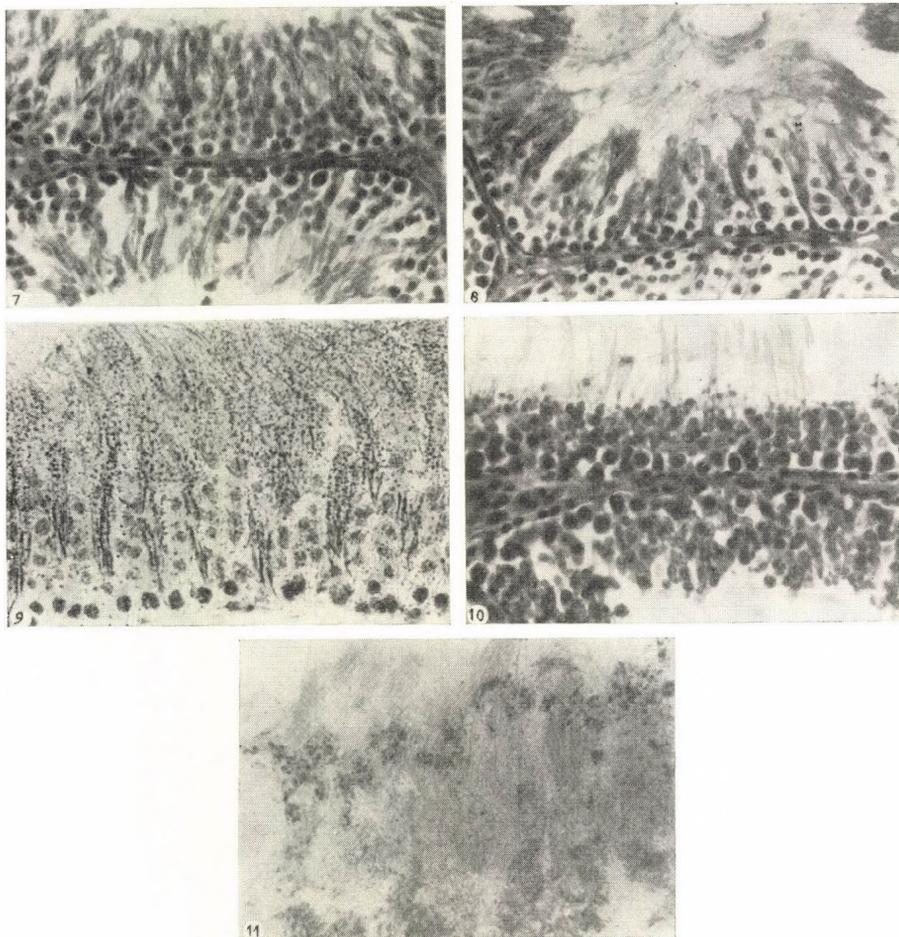


Abb. 7—11. Erklärung im Text

Györgyi—Krebs-Zyklus (Sukzinodehydrogenase), des Pentose-Zyklus (Glykose-6-phosphatdehydrogenase) und der Glykolyse (α -Glyzerophosphat-, Alkohol- und Laktatdehydrogenase). Daneben gibt die Untersuchung der TPN- und DPN-Diaphorase im allgemeinen Aufklärung über die Aktivität der mit TPN und DPN funktionierenden Dehydrogenasen.

Wie die Ergebnisse zeigten, ist die intensive Aktivität der erwähnten Zyklen im Verlauf der Spermiogenese an zwei Stellen anzutreffen: Erstens zu Beginn des spermiogenetischen Prozesses, in der Schicht der jungen Spermiozyten, was überrascht, weil diese bisher für ruhende Spermiozyten gehalten wurden. Es scheint indessen, daß in diesen Zellen sehr lebhaft Stoffwechsellätigkeit stattfindet. Wahrscheinlich gehen in diesen Zellen die energiebeanspruchenden Prozesse vor sich, welche die meiotischen Reifungsteilungen vorbereiten. Die starke Aktivität der drei Zyklen finden wir andererseits auch am Ende des spermiogenetischen Prozesses, im sog. Reifungsstadium der Spermien, wenn die Spermien in die Sertolischen Zellen eindringen und dort die Differenzierung des Kopfes und Mittelstückes zum Abschluß kommt, wonach sie die Sertolischen Zellen verlassen. Im Zusammenhang mit dieser starken Aktivität fällt noch auf, daß sie auch im sog. überflüssigen, desquamierten Plasmateil der Spermien solange anzutreffen ist, bis die Spermien im Kanalumen verschwinden. Daraus schließen wir, daß diese Plasmateile eine wichtige Rolle in den erwähnten Reifungsprozessen spielen.

In den Mitochondrien der entstandenen Spermien verstärkt sich die Aktivität der Enzyme, welche die glykolytischen Prozesse katalysieren (Alkohol- und α -Glyzerophosphatdehydrogenase).

LITERATUR

1. EBNER, V. VON (1871), Untersuchungen über den Bau der Samenkanälchen und die Entwicklung der Spermatozoiden bei den Säugethieren und beim Menschen. Rollet's Untersuchungen aus dem Institut für Physiologie und Histologie in Graz. Engelmann, Leipzig.
2. PEARSE, A. G. E. (1960), Histochemistry, theoretical and applied. Churchill, Ltd., London.
3. ROOSEN-RUNGE, E. C., GIESEL, L. O. JR. (1950), Quantitative studies on spermatogenesis in the albino rat. *Amer. J. Anat.*, **47**, 1—30.

BEMERKUNGEN ÜBER HISTOCHEMISCHE UND HORMONALE FRAGEN DER SPERMIOGENESE

T. RUČKI

I. KLINIK FÜR GEBURTS- UND FRAUENHEILKUNDE, MEDIZINISCHE AKADEMIE, POZNAN
UND INSTITUT FÜR HISTOLOGIE UND EMBRYOLOGIE, MEDIZINISCHE AKADEMIE, POZNAN

Zusammenfassung

Verf. untersuchte das Verhalten des Keimepithels und der Leydigischen Zellen des menschlichen embryonalen und postembryonalen Hodens mit histochemischen Methoden. Die Resultate ergaben, daß die Leydigischen Zellen die größte Aktivität zwischen den 14. und 22. Schwangerschaftswochen aufwiesen. Das Keimepithel enthält Glykogen bereits um die 18. Schwangerschaftswoche; postembryonal ist es reichlich in den genetischen und Sertolischen Zellen zu finden. Schließlich befaßt sich Verf. mit den sog. Farnkristallen und den Andro- und Gynospemien sowie deren Bedeutung.

Im Anschluß an den Vortrag von Herrn Dr. PÓSZALAKY (Histochemische Untersuchungen der Spermio-genese) möchte ich unsere Untersuchungen mitteilen, die sich mit histochemischen Fragen beim menschlichen Hoden im Verlauf seiner Histogenese beschäftigten. Es wurden von uns alle Stadien des sich entwickelnden Hodens untersucht und zwar der embryonale, der postnatale sowie der im Wachstum begriffene Hoden. (Die Untersuchungen wurden unter Leitung des Herrn Prof. Dr. K. MIETKIEWSKI und unter Mitarbeit von Dr. CYMERS, RUCKI, WALCZAK durchgeführt.) Uns interessierten besonders zwei Probleme:

1. Fragen der embryonalen und postembryonalen Entwicklung der Leydigischen Zwischenzellen unter Berücksichtigung ausgewählter histochemischer Methoden.
2. Fragen histochemischer Veränderungen im Keimepithel des embryonalen und postembryonalen Hodens einschließlich bis zum Zeitpunkt seiner Reife.

Besonders möchten wir auf die deutliche Vermehrung und verstärkte Aktivität der Leydigischen Zwischenzellen zwischen den 14. und 22. Schwangerschaftswochen hinweisen. In diesem Zeitabschnitt stellten wir im Zytoplasma dieser Zellen die Anwesenheit von Cholesterinverbindungen (LIEBERMANN-SCHULTZ), von 1-Askorbinsäure, von Mukopolysacchariden, von Phospholipiden (R. nach SMITH—DIETRICH) fest. Alle Reaktionen fielen am deutlichsten in der Golgi-Zone aus. Der positive Ausfall dieser Reaktionen weist wohl darauf hin, daß diese Substanzen bei der Hormonsynthese im embryonalen Hoden beteiligt sind. Es ist bemerkenswert, daß genau die gleichen histochemischen Reaktionen in den sich neu entwickelnden Leydigischen Zwischenzellen vor der eigentlichen Geschlechtsreife im postembryonalen Leben auftreten.

Dieser überaus deutliche Funktionszustand der Leydigischen Zellen zwischen den ungefähr 14.—22. Schwangerschaftswochen kann wohl mit einem erhöhten Bedarf an androgenen Substanzen der sich differenzierenden Urniere

verknüpft sein und mit der Tatsache, daß in diesem Zeitpunkt eine weitere Entwicklung der Müllerschen Gänge gehemmt wird. Bekanntlich überwiegt die Meinung, daß trotz der typischen Wirkung des vom embryonalen Hoden produzierten Hormons dieser Wirkstoff nicht mit dem vom reifen Hoden identisch ist.

Im Keimepithel des embryonalen Hodens stellten wir schon um die 18. Schwangerschaftswoche mit Hilfe der PAS-Reaktion und der Reaktion nach BEST Glykogen in den Spermatogonien fest. Reichlich Glykogen enthielten außerdem die Sertolischen Stützzellen.

Wir glauben, daß das in diesem Zeitpunkt reichlich vorhandene Glykogen als Energiequelle für weitere morphogenetische und zytogenetische Entwicklungsprozesse im Hoden anzusehen ist.

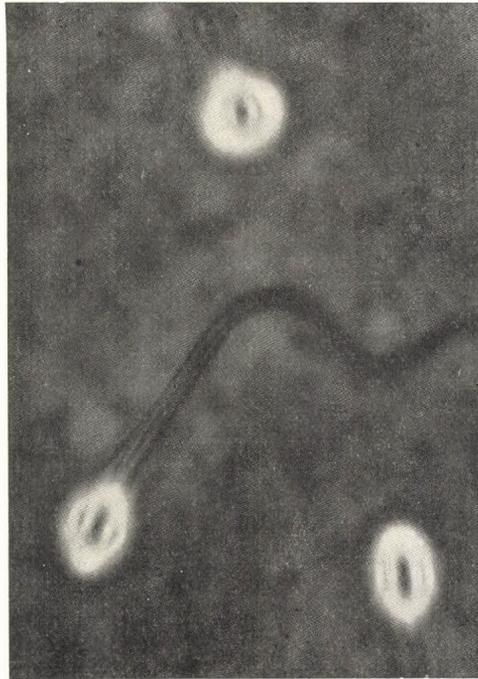


Abb. 1. Andro- und Gynospemien

Während der postembryonalen Entwicklung des Hodens weisen wir auf reichliches Glykogen-Vorkommen in Spermatogonien, Spermatozyten und Sertolischen Zellen sowie auf das frei in der Lichtung der Tubuli liegende Glykogen kurz vor der Spermio-genese hin.

Wir stellten Glykogen im Zytoplasma und in den Kernen der Spermatozyten fest. Im Verlauf der Spermienreifung kommt es zu einer positiven Reaktion auf Mukopolysacchariden in der Gegend des künftigen Acrosoms. Höchstwahrscheinlich ermöglichen oder erleichtern diese Mukopolysacchariden den Kontakt der eben ausreifenden Spermien mit dem Zytoplasma der Sertolischen Zellen.

Im Verlauf der postembryonalen Hodenreifung stellten wir zahlreiche ins Lumen der Samenkanälchen abschilfernde Spermatozyten mit häufigen Endomotosen fest.

Nach den Untersuchungen von MIETKIEWSKI [1] liefern die zahlreichen abschilfernden Spermatozyten nach ihrem Zerfall im Lumen der Nebenhodenkanälchen Spermien an Nukleoproteiden reiche Stoffe und regen die Epithelzellen des Nebenhodens zur sekretorischen Tätigkeit an.

Ein anderes Problem, das mit der Spermiogenese zusammenhängt, ist die Rolle der Hormone. Manche Autoren (MADDOCK und NELSON) neigen heute zu der Annahme, daß die Östrogene eine außerordentlich große Rolle in dem Regulationsprinzip Hypophyse-Gonade spielen. Die Wirkung und auch die Östrogenbildung im Hoden ist noch nicht ganz geklärt.

Bei der Frau kommt es im Verlauf des Zyklus zur Zeit der Ovulation, also zur Zeit der Höhe der Östrogenausscheidung, zur Bildung der sog. Farnkristalle im Zervixschleim. Eine ganz ähnliche Kristallisation haben wir in der Spermaflüssigkeit festgestellt. Da wir zu diesen Untersuchungen den Rest der Spermaflüssigkeit durch Exprimieren des Penis entnommen haben, kann man annehmen, daß sie hauptsächlich aus den Cowperschen Drüsen und der Prostata stammt. (Die Kristallisation kommt aber nicht immer vor.) Gibt es also auch in diesen Drüsen, ähnlich wie bei der Frau in der Zervix, zyklische Veränderungen? Im Lichte dieser Beobachtungen wäre auch vielleicht das umstrittene sog. Klimax virile möglich.

Das Vorkommen der Farnkristalle könnte auch durch eine relative Östrogenausscheidung veranlaßt sein. Andere Bestandteile der Spermaflüssigkeit können vielleicht die Kristallisation hemmen.

Die zyklischen Schwankungen können auch vielleicht an der Heranreifung der Spermien teilnehmen. Bei manchen Männern gibt es bekanntlich nur sog. Androspermien. Zum Nachweis der Gyno- und Androspermien haben wir die Methode der Mikroaufnahmen im Fasokontrast benutzt (SHETTLES; Abb. 1). Spermaausstrich wird ausgetrocknet und nicht gefärbt. Die Gynospemien haben im Kopf ein Stäbchen, die Androspermien nur einen Punkt.

Dies sind aber nur Hypothesen und müssen in weiteren Untersuchungen bestätigt werden.

LITERATUR

1. MIETKIEWSKI, K. (1957), Sur l'histogenèse de l'épididyme du cobaye. *Archives d'anatomie, d'histologie et d'embryologie (Strasbourg)*, 256—306.
2. MIETKIEWSKI, K. (1936/37), Badania morfologiczne, cytologiczne i histofizjologiczne nad najadrczem swinski morskiej (Recherches morphologiques, cytologiques et histophysiologiques sur l'épididyme du cobaye). *Folia morph. (Warszawa)* (Separatum), Vol. VII., 21—83.
3. MIETKIEWSKI, K. (1949), Badania nad układem płciowym męskim szczura i swinski morskiej. **7, 2**, 111—214. (Recherches expérimentales sur le système génital mâle du rat et du cobaye). *Soc. des Amis des Sciences et des Lettres de Poznan. Classe de Médecine. VIII, Fasc. 2.*, 112—214.
4. MIETKIEWSKI, K. (1948), Sur les changements saisonniers dans l'épididyme de la taupe. *Bulletin Histol. Appliquée*, **3**, 49—68.
5. MIETKIEWSKI, K. (1959), Wpływ estrogenów na przysadkę szczura i układ płciowy (The influence of oestrogens on hypophysis and genital system of rat). *Folia morph. (Warszawa)*, **10**, Nr. 1, 9—28.

BEWEGUNGSVERHÄLTNISSE DER SPERMIIEN AUS SPERMATOZELEN

J. MOLNÁR

UROLOGISCHE KLINIK, MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT, BUDAPEST

Zusammenfassung

Die aus den Hoden stammenden Spermien haben in Hinsicht der Struktur und Motilität außer der wissenschaftlichen auch eine praktische Bedeutung (Anastomose des D. Deferens im Hoden, Nebenhoden). Hodenspermien kann man auf verschiedene Wege gewinnen, doch ist die Zahl der durch Punktion, Biopsie ausgesaugten Spermien äußerst gering. Viel mehr Spermien sind aus Spermatozelen zu erhalten, wobei der Inhalt auch ein mehr physiologisches Untersuchungsmilieu bedeutet.

Spermatozelen sind selten anzutreffen, da sie den Patienten keine Beschwerden verursachen. Meist sind sie ärztliche Nebenfunde. In 16 Fällen konnten wir eine Aspiration des Inhaltes vornehmen und die Flüssigkeit untersuchen. 50% der Spermien zeigten eine Bewegung, doch von verminderter Intensität. Die Energiequelle der Motilität war Dextrose, dessen Werte eine ziemliche Schwankung aufwiesen. Fruktose war in dem Inhalt nicht vorhanden. Der Teilausfall der Bewegung im gleichen Milieu deutet aber mehr auf die Lädiertheit der Spermien. Elektronenmikroskopische Untersuchungen wurden auch unternommen. Einige Daten zeigen auf eine Verminderung der Spermienresistenz. Das Befruchtungsvermögen der Hodenspermien ist vermindert — das haben Tierversuche bewiesen, trotzdem kam es bei einer Spermatozelen-Deferens-Anastomose zur Gravidität. Zum Studium der Hodenspermien wollen wir auch in der Zukunft Spermatozeleinhalte verwenden.

Die Struktur, Bewegungsfähigkeit und Fertilität der aus dem Hoden stammenden Spermien ist wiederholt untersucht worden. Die Resultate gestatten es jedoch kaum, daß wir uns eine klare Meinung bilden.

Die Schwierigkeit besteht vor allem darin, daß es umständlich ist, sich menschliche Hodenspermien zu verschaffen. Die technisch einfachen Tieruntersuchungen bieten keine adäquate Hilfe, weil die menschlichen Samenzellen ein ganz anderes biologisches Gewicht, einen anderen Wert besitzen.

Zur Gewinnung menschlicher Hodenspermien bieten sich mehrere Möglichkeiten:

1. Aus frischen — möglichst von Unfällen stammenden — Leichen entnommene Hoden bzw. Nebenhodenköpfe. Die sich zufällig ergebende Gelegenheit wird noch dadurch beeinträchtigt, daß es nötig ist, die Hoden nach dem Tode sobald als möglich präparieren zu können, bevor noch post mortem Veränderungen in den Spermien zustande kommen.

2. Aus den mit Hodenbiopsie entnommenen Parenchymstückchen läßt sich der Inhalt der Tubuluslumina herauspülen, wodurch jedoch sehr wenige Samenzellen gewonnen werden.

3. Durch Hodenpunktion lassen sich zwar Spermien herausaugen, aber deren Zahl ist gleichfalls außerordentlich gering, gegebenenfalls sind sie auch

lädiert, so daß sie sich zur Durchführung von Untersuchungen praktisch kaum eignen.

4. Dasselbe gilt für die aus dem Nebenhodenkopf durch Aspiration gewonnenen Samenzellen, obgleich man auf diese Weise mehr Spermien gewinnt. Dieses Verfahren ist mit der Gefahr verknüpft, daß nach der Punktion feine Narben auftreten, die den einfachen Nebenhodenkanal verschließen. Nach bilateralem Eingriff kann demnach sogar Aspermie zustande kommen.

Die besten Möglichkeiten bietet somit der post mortem gewonnene Hodenextrakt. DOEFFMER [1, 2] erzielte auf diese Weise 3 Millionen Spermien je ml pro 1 g Hodengewebe.

Die Untersuchung der Hodenspermien ist vor allem in wissenschaftlicher Beziehung wichtig. Ein Vergleich der Ejakulat- mit den Hodenspermien gestattet in erster Linie die Beantwortung der Frage, inwieweit die Eigenschaften der Spermien durch den Aufenthalt im langen Nebenhodenkanal verändert werden. Vielleicht könnte man auf diesem Wege die auch heute noch nicht geklärte Rolle des Nebenhodens, den sog. Reifungsprozeß, erhellen.

Hauptsächlich in Tierversuchen hat man festgestellt [3, 8], daß die Spermien über ein um so stärkeres Zeugungsvermögen verfügen, je weiter sie vom Hoden gelangt sind. Laut MUNRO [8] wurden Eizellen von Hahn-spermien aus dem Hoden in 0,78% der Fälle, aus dem Nebenhoden zu 3,57% und aus dem Samenleiter zu 63,20% befruchtet. KNAUS [5] und LANZ [4] vermochten mit den aus dem Nebenhodenkopf von Tieren entnommenen Spermien in keinem Fall Zeugung herbeizuführen, selbst dann nicht, wenn sie die Spermien im Kopf (durch Unterbindung des ableitenden Samenstrangs) zu monatelanger Stase zwangen.

Aus dieser und anderen ähnlichen Beobachtungen folgt, daß — zumindest hinsichtlich der Zeugungsfähigkeit — *zwischen den Spermien des Hodens und Ejakulates ein Unterschied besteht*. Demgegenüber stimmen die aus dem Nebenhodenschwanz stammenden Spermien in quantitativer und qualitativer Beziehung mit den entsprechenden Eigenschaften der Samenzellen des Ejakulats überein.

Wir haben versucht, die Untersuchung der Hodenspermien auf andere Weise zu verwirklichen. Diese Möglichkeit boten die *Spermatozelen*.

Die Spermatozele wird selten vom Arzt beobachtet. Es handelt sich um neben einem Hoden, in der Regel darüber gelegene pfefferkorn- bis faustgroße, meist jedoch hodengroße Gebilde, die keine Beschwerden verursachen, und mitunter ist der Kranke sogar stolz darauf, einen »dritten Hoden« zu haben. Teils aus diesem Grunde, teils wegen der Beschwerdefreiheit willigen die Kranken nicht ein, daß man sich damit befaßt oder den Inhalt punktiert. So bietet sich recht selten die Gelegenheit, den Inhalt zu untersuchen, und darauf beruht es, daß in den letzten 10 Jahren lediglich 16 unserer Kranken die Korrektur der Spermatozele verlangt haben, die durch Absaugung des Inhalts geschah. Als eine endgültige therapeutische Lösung ist das natürlich nicht zu betrachten, aber die Kranken haben nur hierzu ihre Zustimmung gegeben. Zweimal ist auch die Wiederauffüllung der Spermatozele vorgekommen.

Es soll hier nicht auf die pathologische Anatomie der Spermatozele eingegangen, sondern nur darauf hingewiesen werden, daß efferente Hoden-Tubuli in dieses zystenartige Gebilde münden und ständig ihre Spermien hier ablagern. Die Samenzellen gelangen demnach aus dem Hoden direkt in diese eigentlich physiologische Umgebung, so daß sich unseres Erachtens *eine ideale*

Möglichkeit zum Studium der Hodenspermien ergibt. Mit diesem Medium haben wir noch weitere Absichten; jetzt sollen nur einige Angaben herausgegriffen werden, die bei der Klärung der Bewegungsfähigkeit der Spermien verwertet werden können.

Das »Spermaplasma« ist in diesem Fall der transsudatartige Inhalt der Zysten. Außer dem prozentualen Eiweißgehalt interessierten uns jetzt vor allem die Substanzen, welche die Bewegungsenergie ergeben, die *Kohlenhydrate*.

Fruktose-Bestimmungen haben wir wiederholt durchgeführt, doch fielen die Resultate erwartungsgemäß negativ aus, was verständlich ist, da ja die Zystenepithelien oder die Spermien selber keine Fruktose produzieren.

Als interessant haben sich die *Dextrosespiegel* erwiesen, die in der Zusammenstellung zugleich mit dem Prozentsatz der beweglichen Spermien angeführt sind (Tab. 1).

Tabelle 1

Fälle No	Dextrose in mg%	Zahl der bewegl. Spermien (%)	Bemerkung
1	83	40—50	
2	20	50	
3	Spuren	10—20	
4	140	∅	
5	120	∅	81 J., viele Spermien!
6	180	50	
7	150	∅	
8	83	70	
9	21	10—15	
10	60	50—60	
11	26	10	
12	204	1	
13	107	15—20	
14	14	20	
15	∅ (?)	15—20	
16	∅	∅	77 J., Spermium: ∅!

Durchschnittswert : 80,5 mg%

Der Dextrosegehalt lag also nur in 6 Fällen dem Blutserumspiegel nahe. Der Durchschnittswert betrug 80,5 mg%.

Wir versuchten, einen Zusammenhang zwischen dem Bewegungsprozentsatz und dem Dextrosegehalt zu ermitteln, was aber leider nicht gelang. Bei hohem Glukosespiegel (Fälle 6, 12) variierte die Zahl der beweglichen Formen zwischen 1—50%, bei Mittelwerten (Fälle 1, 4, 5, 7, 8 und 13) zwischen 0 und

50%, bei niedrigem Niveau (Fälle 2, 3, 9, 10, 11, 14, 15 und 16) zwischen 0 und 60%. Diese Ergebnisse sind einstweilen als nichtssagend zu betrachten, weil sie keine Aufklärung über das Ausmaß des Dextroseabbaus, der Eindickung, der aktiven Sekretion geben (was in Ermanglung entsprechender Zellen ja auch schwer vorstellbar ist).

Etwas aber beweisen sie doch — das übrigens bekannt ist —, daß nämlich *die Hodenspermien sich bewegen können*. Allerdings bleibt ihre Motilität qualitativ weit hinter der der Ejakulatspermien zurück, sie bewegen sich kaum vorwärts, in anderen Fällen winden sie sich nur. Da wir jedoch auch 50—70%ige Werte angetroffen haben, kann kein Zweifel bestehen, daß diese Zellen zur Bewegung fähig sind und sich in entsprechender Umgebung auch bewegen. Leider haben wir noch nicht versuchen können, eine Steigerung der Bewegung unter Anwendung des Doepfnerschen isotonischen Ammoniumchlorid-Verfahrens auszulösen, weil wir die Methode erst unlängst kennenlernten.

Wieder ergibt sich indessen die Frage, warum die anderen Spermien unbeweglich bleiben, wenn sich ein gewisser Prozentsatz der Spermien im Spermatozeleninhalt bewegt. Die Umgebung ist die gleiche, die Bedingungen stimmen überein. Offensichtlich beruht der Fehler auf der Struktur der Spermien. In gefärbten Präparaten sieht man indessen größtenteils einwandfrei erscheinende Spermien. Die Zahl der pathologischen Formen hat zwar zugenommen, sie beträgt im allgemeinen 40—50%, und unter ihnen dominieren die Kopfveränderungen. Auch Anisospermie ist zu beobachten. Am auffallendsten schien uns die Verminderung des Plasmaabschnitts der Köpfe. Wenn wir auch biometrische Messungen nicht vorgenommen haben, trat diese Veränderung doch deutlich zutage, d. h. nicht der an und für sich intensiv gefärbte Kern war vergrößert. Sehr gleichmäßig entwickelt waren die Schwänze. Spermatozelen und Spermatozyten waren hier und da anwesend.

Um die feineren Einzelheiten feststellen zu können, haben wir ein Präparat (Fall Nr. 14) elektronenmikroskopisch untersucht. Die Untersuchung ist noch im Gange, hier wollen wir nur einige Übersichtsbilder zeigen (Abb. 1).

Den nicht vollwertigen Zustand der Hodenspermien wollen wir auch mit einigen biologischen Angaben beweisen. Die Bewegung hört ziemlich rasch auf; in einigen Fällen ist die Bewegung der ursprünglich beweglichen Spermien nach 2 Stunden zum Stillstand gekommen. Als die Zelenflüssigkeit 24 Stunden im Eisschrank aufbewahrt wurde, fanden wir nach der Erwärmung keine Samenzellen, die sich wieder bewegten. Aus diesen Befunden könnte man auch schließen, daß die Resistenz dieser Spermien geringer ist als die der Samenzellen des Ejakulats.

Auf die Zeugungsfähigkeit der Hodenspermien deutet demgegenüber einer unserer interessanten Operationsfälle.

Bei einem 34jährigen Mann planten wir wegen Aspermie, die unserer Meinung nach auf Verschluß beruhte, die Herstellung einer Vaso-Epididymo-Anastomose. Über beiden Hoden war ein fingerbeergroßer Knoten tastbar, der als Spermatozele imponierte. Bei der Erschließung stellte sich heraus, daß eine angeborene Stenose zwischen Kopf und Körper anwesend war. Bei dem Kranken fanden wir auch andere Entwicklungsanomalien, so z. B. polyzystische Nieren.

Da sich die Diagnose der Spermatozele als richtig erwies und ihr aspirierter Inhalt — zwar unbewegliche — Spermien enthielt, ließen wir den Deferens-Stumpf hier einmünden (BABICS), d. h. es wurde eine Spermatozelen-Deferens-Anastomose hergestellt. Nach ungestörter Wundheilung wurde im 3., 6. und 12. Monat eine Spermauntersuchung vorgenommen, die stets ein aspermisches Bild ergab. Nach 2 Jahren brachte die Ehefrau des Patienten

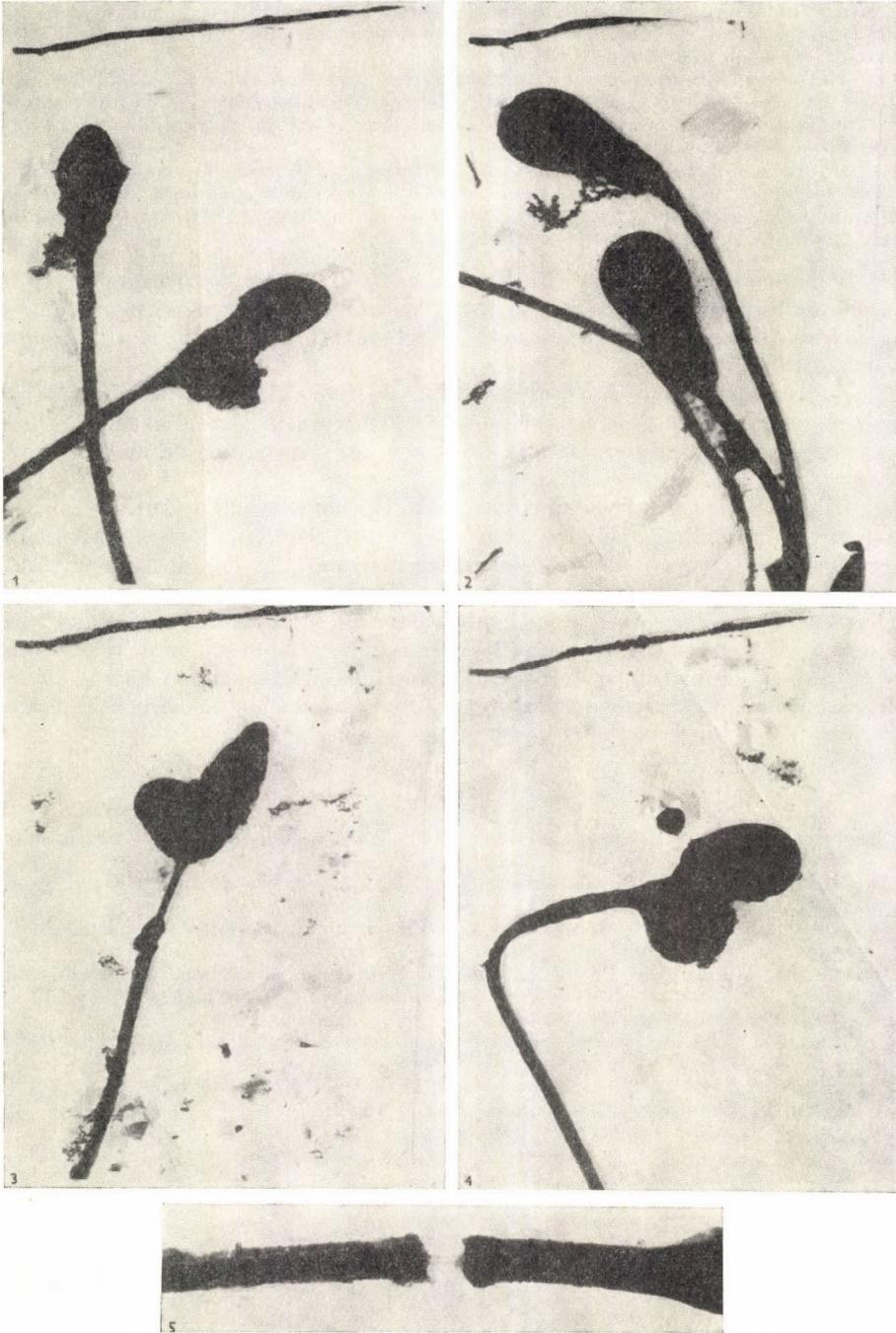


Abb. 1. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Spermien aus einer Spermatozele (teils pathologische Formen)

ein Kind zur Welt, und nach weiteren 3 Jahren kam er schließlich mit seinem Kind nach Budapest und willigte in die Kontrolluntersuchung ein. Wir fanden im Ejakulat Spermien, die sich aber nicht bewegten.

Natürlich kann man in der Frage der Vaterschaft skeptisch sein, aber Tatsache ist, daß die Passage wiederhergestellt war. Möglicherweise haben sich die Spermien zur Zeit der Empfängnis bewegt, was wir jedoch — ebensowenig wie das Gegenteil — nicht direkt zu beweisen vermögen.

Im übrigen teilen wir durchaus die Auffassung, daß keine Transplantation in den Hoden vorgenommen werden soll, weil schlechte Ergebnisse zustande kommen, selbst wenn die Rekanalisation wiederhergestellt wird. Tatsächlich haben wir seit 10 Jahren keine Hoden-Deferens-Anastomose ausgeführt.

Mit der Beschreibung dieses Falles sollte dargelegt werden, daß die Hodenspermien, wenn sie sich mit dem prostato-vesikulären Sekret vereinigen, ungeachtet ihrer Minderwertigkeit anscheinend imstande sind, Zeugung herbeizuführen.

Zusammenfassend darf festgestellt werden, daß die Hodenspermien bewegungsfähig sind. Das ist bekannt ebenso wie die Tatsache, daß sie auch in Ermanglung von Fruktose mit Dextrose zur Bewegung veranlaßt werden können.

Obleich der Dextrosespiegel in den Spermatozelen mitunter hoch ist, machen die beweglichen Formen nur etwa die Hälfte der dort anzutreffenden Spermien aus. Daraus darf geschlossen werden, daß der Fehler in der Struktur der Spermien liegt. Selbst die beweglichen Hodenspermien sind nicht als vollwertig zu betrachten, weil sie — wahrscheinlich strukturell — vielmehr aber biologisch Differenzen aufweisen. Weitere Untersuchungen zur Klarstellung der Unterschiede zwischen den Hoden- und Ejakulatspermien haben wir eingeleitet, wobei wir auch fernerhin aus Spermatozelen stammende Samenzellen zu verwenden beabsichtigen.

LITERATUR

1. DOEPFNER, R. (1956), Untersuchungen über die Morphologie und die Motilität von Hodenspermien. *Acta genet. (Basel)*, **6**, 279—282.
2. DOEPFNER, R. (1958), Die Bedeutung der Motilität der Spermien für die Zeugungsfähigkeit. *Hautarzt*, **9**, 108—113.
3. IVANOV, E. J. (1944), cit. HOTCHKISS, Fertility in men. Lippincott Co. Philadelphia.
4. LANZ, T., cit. DOEPFNER, R. (2).
5. KNAUS, H. (1954), Die Physiologie der Zeugung des Menschen. Maudrich, Wien.
6. KOVÁCSI, L., MOLNÁR, J. (1949), A spermatocele. *Klinikai Értesítő*, **1**, 12—14. (In ungarischer Sprache.)
7. MOLNÁR, J. (1958), Az emberi spermiumok mozgása. *Magy. Tud. Akad., Orv. Osztályközl.*, **9**, 247—255. (In ungarischer Sprache.)
8. MUNRO, S. S. (1938), Effect of dilution and density on fertilizing capacity of fowl sperm in excretory ducts. *Canad. J. Res.* **16**, 281.

ZUR FRAGE DER MISSERFOLGE BEI HOMOLOGEN SAMENÜBERTRAGUNGEN

R. DOEPFMER

UNIVERSITÄTS-HAUTKLINIK, BONN

Zusammenfassung

10—20% aller sterilen Ehen sind durch die Subfertilität beider Ehepartner bedingt. In diesen Fällen kann eine Subfertilität nicht durch eine hohe Fertilität des anderen Ehepartners ausgeglichen werden. Gerade bei diesen Patienten sollte nach Aufklärung über das Konzeptionsoptimum und nach einer Behandlung ohne Erfolg untersucht werden, ob die Indikation für eine homologe Samenübertragung gegeben ist. In der Arbeit wurden eingehend die Indikationen und Kontraindikationen zur homologen Samenübertragung dargestellt. Die bisherigen Befruchtungsergebnisse bei homologen Samenübertragungen betragen im Gegensatz zu denen bei heterologen (60—90%) nach den bisherigen Erfahrungen nur 10% (bis höchstens 30%).

Die Mißerfolge bei homologen Samenübertragungen können durch Schädigungen in den Spermien selbst, aber auch durch schädigende, bis heute noch wenig erforschte Substanzen im Spermaliquor bedingt sein. Bei bestimmten Veränderungen der Spermien und des Spermaliquors soll die Indikation zur künstlichen Samenübertragung mit größter Vorsicht gestellt werden.

Den zahlreichen fördernden Eigenschaften des Spermaliquors stehen hemmende Eigenschaften (anorganische und organische toxische Substanzen, bakterielle Verunreinigungen und ganz besonders antigenwirkende Substanzen) gegenüber. In eigenen Untersuchungen wurde nachgewiesen, daß durch Trennung der Spermien vom Spermaliquor nach dem Zentrifugieren und Auswaschen mit einer stimulierenden Lösung die Qualität und Quantität der Motilität nicht wesentlich beeinträchtigt werden.

Die Quantität der Motilität sinkt bei 10 Minuten langer Zentrifugation mit 1000 Umdrehungen in der Minute nur um 5—10% ab; die Qualität der Motilität zeigte bei dieser Maßnahme keine wesentliche Veränderung. Bei wiederholten erfolglosen homologen Samenübertragungen und ganz besonders beim Nachweis von Spermienagglutinationen im Ejakulat sollte versucht werden, den Spermienliquor von den Spermien zu trennen.

Nach den Erfahrungen der Weltliteratur sind sterile Ehen durch Ursachen bei der Frau in 40—50%, beim Mann in 30—40% und bei *beiden Ehepartnern* in 10—20% der Beobachtungen bedingt. Eine Subfertilität beider Ehepartner führt ohne Zweifel öfters als bisher angenommen zu einer sterilen Ehe. In manchen Ehen kann eine Subfertilität eines Ehepartners oder einer Ehepartnerin durch eine hohe Fertilität des anderen Partners nicht ausgeglichen werden.

Unter den Patienten, die die Fertilitätssprechstunde aufsuchen, finden wir am häufigsten Veränderungen mit Oligo-Asthenoteratospermien im Spermogramm. Bei diesem Zustand sind infolge einer Tubulusschädigung die Zahl vermindert, die Quantität und Qualität der Motilität herabgesetzt, die pathologisch geformten Spermien und die Zellen der Samenreifungsreihe deutlich vermehrt.

Eine sichere Therapie der Oligo-Astheno-Teratospermie als Ausdruck eines primären Hodenschadens kennen wir bis heute nicht. Aus diesem Grunde empfiehlt es sich, die Patienten über das Konzeptionsoptimum aufzuklären und der Ehefrau das lästige Messen der Basaltemperatur zuzumuten.

Die Indikationen zur homologen Samenübertragung

Von verschiedenen Autoren werden die Indikationen zu einer homologen Samenübertragung sehr verschieden gestellt (Literatur bei [20]). Bei mehr oder minder hochgradigen Veränderungen des Ejakulats werden im Hinblick auf mögliche Schäden der Kinder Inseminationen überhaupt nicht versucht. Wir glauben, daß bei pathologischen Veränderungen der Spermien oder des Spermaliquors vielfach Letalfaktoren vorhanden sind, durch die glücklicherweise eine Konzeption verhindert wird.

Im Folgenden haben wir die Indikationen zu homologen Samenübertragungen aufgegliedert und nach Störungen bei der Frau, beim Manne und bei beiden Ehepartnern aufgeführt.

1. Bei der Frau

a) Funktionelle und psychogen bedingte Störungen (Tubenspasmen, Dyspareunie, Frigidität).

b) Anatomisch-mechanische Hindernisse:

In der Vagina (Atresie, Stenose, abnorme Enge oder Länge).

In der Zervix (Stenose, abnorme Länge).

Im Uterus (extreme Lageanomalien).

Spermareflux (bei Anomalien der Vagina, nach Dammrissen).

c) Veränderungen des Zervixsekretes (Hypo- oder Hypersekretion, pH-Verschiebungen, bakterielle Besiedlung, chronisch-entzündliche Veränderungen).

d) Mißbildungen oder Hypoplasie des Genitalapparats.

2. Beim Manne

a) Ejaculatio praecox,

b) Impotentia coeundi.

Funktionell oder psychogen bedingte Störungen. Innere Krankheiten (Hypotonie, Hypertonie, Hypophysenkrankheiten, Hypothyreose oder Hyperthyreose, Diabetes mellitus, Nebennierenunterfunktionen, Leberkrankheiten, Anämien). Nerval bedingte Schädigungen des Erektionszentrums (Querschnittslähmungen, multiple Sklerose, Tabes dorsalis). Krankheiten im Bereich des Penis (Induratio penis plastica, posttraumatische Veränderungen, Tumoren).

c) Anatomisch-mechanische Hindernisse:

Mißbildungen (Penismangel, hochgradige Penishypoplasie, Epispadie, Hypospadias scrotalis). Penis permagnus, große Hernien. Hochgradige Adipositas.

d) Aspermatismus bei normaler Spermiogenese:

Psychogen bedingter Aspermatismus. Bei nervalen Störungen (Querschnittslähmungen, Nervenkrankheiten). Retrograde Ejakulation in die Blase (Prostatektomien, Strikturen der Urethra, Mißbildungen in der Prostata, Urethradivertikel, postinfektiöse, narbige Folgezustände). Retrograde Ejakulation bei Urethrektalfistel in den Mastdarm.

e) Aspermie bei normaler Spermiogenese:

Funktionelle Aspermie (WEYENETH [28]) oder Aspermie infolge Verschlusses der samenaufführenden Wege durch Traumen, postinfektiöse Folgezustände oder Mißbildungen.

f) Pathologische Veränderungen des Ejakulates:

Oligospermie (relative Oligospermie bei Multispermie, Stenose der samenaufführenden Wege). Asthenospermie. Teratospermie. Oligo-Astheno-Teratospermie leichten Grades. Spermienagglutinationen.

g) Pathologische Zusammensetzung des Spermaliquors:

Krankheiten oder Mißbildungen der akzessorischen Geschlechtsorgane. Spermienagglutinine, Afermentie, verminderte Fruktose, Parvispermie.

h) Samenübertragungen des normalen, konservierten, meist tiefgefrorenen Samens (*insémination à grande distance, indication de guerre*)

3. Bei beiden Ehepartnern

a) Die häufige Subfertilität beider Partner (Genitalhypoplasie der Ehefrau und geringgradige Oligo-Astheno-Teratospermie des Ehemannes).

b) Psychische Abwegigkeiten beider Partner.

c) Sog. biologische Sterilität der Ehe bei klinisch, spermatologisch und hormonal gesunden Partnern (Spermaimmunität).

Die oben aufgeführten Indikationen sind sehr weit gefaßt. Einzelheiten zur Voraussetzung der Spermengewinnung wie z. B. bei einer Aspermie durch einen operativen Eingriff oder bei einem Aspermatismus durch den elektrophysikalischen Ejakulationstest können in dem Handbuch »Fertilitätsstörungen beim Manne« nachgelesen werden.

Die Gegenindikationen zur homologen Samenübertragung

Gegenindikationen zu einer künstlichen homologen Samenübertragung sind vielfach umstritten, da bis heute noch sehr wenige Erfahrungen gesammelt werden konnten und katamnestische Untersuchungen an Kindern, die durch homologe Samenübertragungen gezeugt wurden, nicht vorliegen. Im Folgenden haben wir einige Gegenindikationen zusammengestellt:

1. Manifeste Erbkrankheiten, Endokrinopathien oder multiple Mißbildungen.

2. Verwandtenehen mit erblicher Belastung, wenn sich auch vielfach Erbprognosen als falsch erweisen.

3. Jede Veränderung im männlichen und weiblichen Genitaltrakt oder Allgemeinkrankheiten, bei denen eine negative Beeinflussung der einzelnen Keimzellen sowohl in den Genen als auch im Plasma möglich ist.

4. Entzündliche Prozesse im Bereiche der männlichen Genitale (Pyospermie oder Häospermie) oder bei der Frau entzündliche Prozesse im Bereich der Tuben, des Uterus oder der Zervix.

5. Die Einnahme gewisser Medikamente oder Röntgenbestrahlungen.

Der Samen vom Ehemann oder von Spendern darf für eine Samenübertragung dann nicht verwendet werden, wenn 2—4 Monate vor dieser Maßnahme therapeutische oder diagnostische Röntgenbestrahlungen durchgeführt wurden oder Zytostatika oder andere Medikamente mit noch unbekannter Wirkung über einen Zeitraum von mehreren Wochen verabreicht wurden.

6. Eine wichtige, bisher noch wenig beachtete Kontraindikation stellen unter den Neoplasmen ganz besonders maligne Melanome bei der Frau dar. Maligne Melanome können trotz ausreichender Vorbehandlung mit Röntgenbestrahlung oder nach einer radikalen Operation durch den provokativen Reiz der Gravidität mit einem Neuauftreten dieses Tumors, und nach eigenen Beobachtungen sogar mit zahlreichen Metastasen dieses Tumors wieder manifest werden. Allen Patientinnen mit einem behandelten malignen Melanom schlagen wir daher vor, entweder überhaupt oder wenigstens 5 Jahre eine Konzeption zu vermeiden.

Oligo-Astheno-Teratospermien mäßigen Grades sehen wir nicht als Kontraindikation an, da nach den bisherigen Erfahrungen der Mitteilungen in der Weltliteratur offenbar nicht mit Schädigungen des Kindes zu rechnen ist und durch Letalfaktoren die Konzeption verhindert wird.

Die Ansichten über das häufige Vorkommen von Mißbildungen oder von Aborten bei Frauen, deren Ehemänner pathologische Spermogramme mit Oligo-Astheno-Teratospermien hatten, werden nicht einheitlich beurteilt. HINGLAIS und HINGLAIS [8], JOËL [12] und NIENDORF [17] beobachteten bei pathologisch veränderten Ejakulaten und normalem Genitalbefund der Frau häufig Aborte. MACLEOD und GOLD [15], HOTCHKISS [9, 10] und RUSSELL [19] konnten jedoch diese Beobachtungen nicht sicher bestätigen. Beim Auftreten von Mißbildungen und Aborten ist zu berücksichtigen, daß offenbar häufig mehrere Ursachen eine wichtige Rolle spielen.

MACLEOD und GOLD [15] sahen ebenso wie wir abnorme Schwangerschaften sowohl bei extremen Oligospermien als auch bei Polyspermien. Die Tatsache, daß Patienten mit Oligo-Astheno-Teratospermien in erster Ehe kinderlos blieben und in anderen Ehen wiederholt normale Kinder zeugten, ist ebenso bekannt wie die Tatsache, daß bei einem offenbar völlig normalen Spermogramm auf Grund bisher noch nicht erfaßbarer Veränderungen eine Infertilität bestehen kann.

In diesem Zusammenhang sei eine wichtige Beobachtung von SEYMOUR erwähnt. Bei einem 11 Jahre lang kinderlos verheirateten Mann ergab die Anamnese keine Besonderheiten. In dem durch Coitus interruptus gewonnenen Ejakulat fand sich eine Spermienzahl von 94 Mill. in ccm, eine ausgezeichnete Qualität der Motilität, eine Bewegungsdauer von 18 Stunden und nur 3% pathologisch geformte Spermien. Klinisch zeigten sich keine pathologischen Befunde. Auch bei der Ehefrau wurden bei der Allgemein- und Genitaluntersuchung keine krankhaften Veränderungen festgestellt. Mit dem Ejakulat dieses gesunden und aus gesunder Familie stammenden Ehemannes wurden bei 17 Frauen ohne Erfolg heterologe Samenübertragungen vorgenommen. Hingegen konnte durch Spendersamen eines anderen Mannes sowohl bei der 11 Jahre kinderlos verheirateten Ehefrau des erwähnten Mannes als auch bei den anderen Frauen während der nächsten 14 Monate eine Schwangerschaft erzielt werden.

Die Erfolge bei Samenübertragungen

Bei der Betrachtung der Erfolgsstatistiken unterscheiden sich die Ergebnisse bei homologen Samenübertragungen recht erheblich von denen bei heterologen.

Bei heterologen Samenübertragungen wurden von SCHELLEN [20] im Durchschnitt 60% Erfolge angegeben. Einige Autoren erzielten jedoch wesentlich bessere Resultate (SHIELDS [23] 94%, WEISMAN [27] 84%, TOPKINS [25] 80%). KLEEGMAN [13] beobachtete nach 1–6 heterologen Übertragungsversuchen bei 90% einen Erfolg und zwar in 30% durch eine einmalige und in 87% durch 2–3 Inseminationen. Ähnlich gute Resultate erzielte SHIELDS [23] bei 32% nach dem ersten Versuch und bei 72% nach den ersten 3 Versuchen.

Im Gegensatz zu diesen guten Resultaten wurden Erfolge bei homologer Samenübertragung nur bei 10 bis höchstens 30% mitgeteilt. Hierbei ist zu berücksichtigen, daß vielleicht sogar von der überwiegenden Mehrzahl der Autoren Mißerfolge überhaupt nicht veröffentlicht wurden.

Die Erfolgsstatistiken über homologe Inseminationen sind aus folgenden Gründen schwer vergleichbar und nur unzureichend auswertbar:

1. Die Anamnese der einzelnen Ehepartner über die Dauer der Kinderlosigkeit, Zahl von Aborten oder Fehlgeburten und ganz besonders das Alter der Frau sind unzureichend.

2. Die klinischen andrologischen und gynäkologischen Befunde werden meist nicht ausreichend berücksichtigt.

3. Mehrmalige Spermioagrammbefunde unter Berücksichtigung der sexuellen Karenz werden oft überhaupt nicht angegeben. Über den so vieldeutigen Begriff »Oligospermie«, unter dem jeder Autor etwas anderes versteht, ist deswegen so wenig auszusagen, weil das wichtigste Kriterium, die Qualität der Motilität, unberücksichtigt bleibt.

4. Die Art der Spermengewinnung (z. B. durch eine elektrophysiologische Methode oder durch Bläschendrüsens-Expression oder Prostata-Expression) ist selten exakt beschrieben.

5. Besonders bei Mitteilungen vor 1940 sind häufig der Ovulationstermin und das Konzeptionsoptimum nicht exakt bestimmt worden.

6. Häufig wurde eine veraltete oder wenig aussichtsreiche (intravaginale statt intrauterine Samendeponierung) Methode angewandt oder es fehlte den Autoren an der entsprechenden Erfahrung bei der Durchführung des keineswegs immer einfachen Eingriffs.

Bei allen Samenübertragungen ist auch zu berücksichtigen, daß die Eiwanderung, die Nidation, die Imprägnation und Konzeption außerordentlich komplizierte und bis jetzt noch nicht steuerbare Vorgänge sind.

Trotz allem ist die Tatsache auffällig, daß die Erfolge bei homologen Samenübertragungen so ungleich viel schlechter als bei heterologen sind.

Durch die Verkürzung des Wegs zum Ei haben einerseits die Spermien mit einer Motilitätsschädigung offenbar in nur seltenen Fällen eine größere Chance für eine Konzeption. Andererseits liegen keine sicheren Erfahrungen darüber vor, daß die natürliche Selektion durch unnatürliche Heranbringung pathologisch veränderter Spermien ausgeschaltet wird und so besondere Gefahren für die Nachkommen entstehen.

Die primäre, genbedingte Schädigung ist bei einer Infertilität eine Hauptursache, jedoch nicht die alleinige.

Die Bedeutung des Spermaliquors

Neuere Beobachtungen machen es wahrscheinlich, daß auch der Spermaliquor schädigende irreparable Einflüsse auf die Spermien ausüben kann. Ohne Zweifel können durch toxische oder sensibilisierende Substanzen im Spermaliquor protoplasmatische Veränderungen an den Spermien hervorgerufen werden. Sie können sich als Letalfaktoren oder als latente Schädigungsfaktoren erweisen. Im Spermaliquor befinden sich fördernde und unter gewissen Bedingungen hemmende Faktoren für die normale Funktion der Spermien.

1. Die fördernden Faktoren:

a) Das Transportieren und ganz besonders das Ausspülen der nicht durch Muskelkontraktionen ejakulierten Spermien.

b) Das Fernhalten von spermenschädigenden Stoffen in dem distalen Urogenitaltrakt.

c) Die Verdünnung der im Nebenhodenschwanz gespeicherten Spermien.

d) Die Erzielung eines die Funktion und den Stoffwechsel aktivierenden Milieus, das sich von dem katabolischen Milieu des Nebenhodenschwanzes wesentlich unterscheidet.

e) Die schützende puffernde Wirkung der Spermien gegenüber dem sauren Vaginalsekret.

f) Die sog. Plombenwirkung durch die Koagulation zur optimalen Einstellung der Spermienmassen vor der Portio und zur Verhinderung eines schnelleren Spermienrückflusses.

g) Möglicherweise die Schaffung einer Energiequelle und Freisetzung von Stimulatoren — insbesondere bei pathologischem Zervixmilieu — durch Inkorporation bestimmter Bestandteile des Spermaliquors.

Bei einem normalen Coitus wandern die Spermien bereits nach wenigen Minuten oder Sekunden in das Zervixsekret, wobei zu beachten ist, daß nach Untersuchungen von MACLEOD und HOTCHKISS [10] im ersten Drittel des Ejakulates 70% aller befruchtungsfähigen Spermien vorhanden sind. Der Spermaliquor dringt mit Sicherheit nicht in das Zervixsekret ein und hat somit keine funktionelle Aufgabe in den höheren weiblichen Genitalabschnitten.

2. Die hemmenden Faktoren:

Den mehr oder weniger nützlichen Eigenschaften des Spermaliquors stehen folgende, heute noch wenig bekannte und erforschte spermenschädigende Faktoren gegenüber:

a) Toxische organische und anorganische Stoffe (MANN).

b) Bakterielle Verunreinigungen.

c) Antigenwirkende Substanzen, insbesondere nach vorausgegangenen entzündlichen Prozessen im Bereiche des Hodens und der Annexe.

Unter den schädigenden Einflüssen sind vor allem Spermienagglutinine im Spermaliquor zu erwähnen [3, 4, 7, 18]. HELLINGA [7] fand von 17 Patienten mit Spermienagglutination im Serum bei 10 Männern ebenfalls Spermienagglutinine im Ejakulat.

WEIL [26] konnte im Spermaliquor von Kaninchen Antigene gegen die eigenen Spermien nachweisen.

Nachdrücklich ist zu betonen, daß der Spermaliquor für das Zustandekommen einer Konzeption nicht erforderlich ist. 1932 konnte KNAUS [14] mit ausgeschwemmten Nebenhodenschwanzspermien gleich gute Befruchtungserfolge wie mit Ejakulatspermien erzielen.

HANSON und ROCK [6] trennten bei Oligospermien zwecks Anreicherung den Spermaliquor von den Spermien. Durch diese Maßnahme konnten diese Autoren ihre Erfolge bei homologen Samenübertragungen bei 7 von 92 Frauen auf 3 von 14 verbessern.

Eigene Untersuchungen

Nach eigenen Untersuchungen unterscheiden sich Nebenhodenschwanzspermien im Hinblick auf Qualität und Quantität der Motilität und der Morphologie nicht von Ejakulatspermien.

Hodenspermien hingegen weisen eine gute Quantität, jedoch eine sehr schlechte Qualität der Motilität auf. In einer mit isotonischer Ammoniumchloridlösung versetzten Suspension von Hodenspermien konnte jedoch die Qualität der Motilität wesentlich verbessert, jedoch nicht zur gleichen Intensität der Bewegung wie bei Nebenhodenschwanz- oder Ejakulatspermien gebracht werden [4].

Erfolge von homologen Samenübertragungen mit Hodenspermien wurden lediglich von ADLER und MARKRIS [1] berichtet.

Wir versuchten 4mal durch Übertragung von Hodenspermien eine Konzeption herbeizuführen. In allen 4 Versuchen wurde trotz Einhaltung des Konzeptionsoptimums und der sorgfältigen Ausschwemmung der Hodenspermien aus Parenchymstücken kein Erfolg erzielt. Weitere eigene Untersuchungen galten der Fragestellung, ob ein pathologisch zusammengesetzter Spermaliquor Ursache für eine Infertilität sein kann.

Bei 2 Patienten mit Spermienagglutinationen trennten wir den Spermaliquor von den Spermien durch Zentrifugieren und Auswaschen in Baker-Lösung. Nach dieser Prozedur waren keine Kopf-zu-Kopf-Agglutinationen mehr nachweisbar.

Trotz des fehlenden Nachweises von Agglutinationen erhebt sich die Frage, ob vor der Ausschwemmung bereits eine irreparable protoplasmatische Schädigung der Spermien zustande gekommen ist. Wir untersuchten daher gemeinsam mit THEIN [24] die Qualität und Quantität der Motilität durch das Zentrifugieren und Auswaschen in verschiedenen Nährlösungen. Bei diesen Versuchen waren wir uns darüber im klaren, daß die Quantität und Qualität der Motilität keineswegs einen sicheren Aufschluß über die Befruchtungsfähigkeit zu geben vermögen. Die Motilität überdauert stets die Befruchtungsfähigkeit der Spermien [5, 29, 30].

Wir zentrifugierten 20 Ejakulate von Patienten mit einer geringgradigen Oligo-Asthenoteratospermie 10 und 25 Minuten bei 1000 Umdrehungen in der Minute. Hierbei fiel die Quantität der Motilität nur geringgradig ab (s. Tab. 1). Die Qualität der Motilität wies bei der subjektiven Ablesung der Qualitätsgrade: ausgezeichnet, gut, ausreichend, mäßig und schlecht meist keinen vollständigen Abfall eines dieser Qualitätsgrade auf. Hingegen sank bei einer Zentrifugationsdauer von 25 Minuten die Qualität der Motilität um einen Grad ab. Bei stündlicher Untersuchung in Abständen von 1 bis 5 Stunden sank die Quantität der Motilität gegenüber dem Nativpräparat geringgradig ab, jedoch nicht wesentlich.

Wurde nach dem Zentrifugieren der überstehende Spermaliquor entfernt und durch Baker-Lösung ersetzt, änderte sich nach einer nochmaligen Zentrifugierung von 10 Minuten bei 1000 Umdrehungen in der Minute die

Tabelle 1

Abfall der Quantität der Spermienmotilität
nach einmaliger Zentrifugierung (10 Min. bei 1000 U./min) und
nach zweimaliger Zentrifugierung (bei je 10 Min. 1000 U./min)
mit Auswaschung in Baker-Lösung nach 1–5 Stunden bei
20 Patienten mit Oligo-Astheno-Teratospermien

Zeit	Nativpräparat %	Zentrifugieren %	Zentrifugieren und Auswaschen %
Sofort	48	42,5	46
1 Stunde	45,3	40,3	42,8
2 Stunden	40,5	35,1	37,6
4 Stunden	37,8	29,2	32,8
5 Stunden	30,5	22,5	25,8

Quantität und Qualität der Motilität nicht wesentlich. Bei Auswaschung mit Baker-Lösung, isotonischer (0,85%iger) Kochsalzlösung und Locke-Lösung zeigte sich bei vergleichenden Untersuchungen die Baker-Lösung der Locke-Lösung geringgradig und der isotonischen Kochsalzlösung wesentlich überlegen (s. Tab. 2). Beim Zusetzen einer Nährlösung ist zu beachten, daß die Spermien

Tabelle 2

Abfall der Quantität der Spermienmotilität
nach Zentrifugieren und Auswaschen bei 10 Min. und 25 Min. Zentri-
fugationsdauer bei 20 Patienten mit Oligo-Astheno-Teratospermien

Dauer des Zentrifugierens	Nativpräparat %	0,85%ige Kochsalzlösung %	Locke-Lösung %	Baker-Lösung %
10 Min.	39	38	43	45
25 Min.	36	34	39	42

nicht zu stark stimuliert werden dürfen, so daß auf diese Weise die Befruchtungsfähigkeit durch eine vorzeitige Erschöpfung verloren geht.

Herr Kollege HYNIE machte uns beim Zentrifugieren auf einen möglichen Störfaktor aufmerksam, durch den sich Spermien mit ausgezeichneter Qualität der Motilität bei nur 1000 Umdrehungen in der Minute nicht sedimentieren und in den mittleren Schichten bleiben, während die asthenischen Spermien sich sedimentieren und gegebenenfalls für eine Samenübertragung verwandt werden. Sollte sich diese Annahme bestätigen, müßte die Zahl der Umdrehungen von 1000 auf 2000 pro Minute vergrößert werden.

Welche Umdrehungszahl, welche Dauer und welche Lösungen für die Trennung der Spermien vom Spermienliquor optimal sind, können wir heute noch nicht sagen. Weitere derartige Untersuchungen für diese so wichtige Fragestellung sollten angestellt werden.

LITERATUR

1. ADLER, L., MAKRIS, A. (1951), *Fertil. and Steril.*, **2**, 459.
2. BORELLI, S., DOEFFMER, R., HEINKE, B. (1960), In *Fertilitätsstörungen beim Manne*. Springer Verlag, Heidelberg.
3. DOEFFMER, R. (1960), In *Fertilitätsstörungen beim Manne*. Springer Verlag, Heidelberg.
4. DOEFFMER, R., FREIHOFF, W. (1956), *Klin. Wschr.*, 275.
5. HAMMOND, J., ASDELL, S. A. (1926), *Brit. J. exp. Biol.*, **4**, 155.
6. HANSON, F. M., ROCK, J. (1951), *Fertil. and Steril.*, **2**, 2.
7. HELLINGA, G. (1949), Noord-hollandsche uitgevers Maatschappij. Amsterdam.
8. HINGLAIS, H., HINGLAIS, M. M. H. (1954), *Presse méd.*, **62**, 4.
9. HOTCHKISS, R. S. (1944), *Fertility in men*. Lippincott, Philadelphia.
10. HOTCHKISS, R. S., MACLEOD (1942), *J. Urol. (Baltimore)*, **48**, 225.
11. HYNIE, J. (1960), persönl. Mitteilung.
12. JOËL, C. A. (1955), *Fertil. and Steril.*, **6**, 459.
13. KLEEGMAN, S. J. (1954), *Fertil. and Steril.*, **5**, 7.
14. KNAUS, H. (1954), *Die Physiologie der Zeugung des Menschen*. Wilhelm Maudrich. Wien.
15. MACLEOD, J., GOLD, R. Z. (1951), *Fertil. and Steril.*, **2**, 394.
16. MANN, T. (1954), *Biochemistry of semen*. Methuen & Co., London.
17. NIENDORF, F. (1953), *Münch. med. Wschr.*, 366.
18. RÜMKE, P., HELLINGA, E. (1959), *Amer. J. clin. Path.*, **35**, 357.
19. RUSSEL, M. (1954), *Fertil. and Steril.*, **5**, 256.
20. SCHELLEN, A. (1957), *Artificial insemination in the human*. Elsevier, Amsterdam.
21. SCHIRREN, C. (1955), *Medizinische*, **24**, 872.
22. SEYMOUR, F. J. (1939), *J. Amer. med. Ass.*, **112**, 1817.
23. SHIELDS, F. E. (1950), *Fertil. and Steril.*, **1**, 271.
24. THEIN, E. (1956), Dissertation, Würzburg.
25. TOPKINS, P. (1939), *Amer. J. Obstet. Gynec.*, **38**, 313.
26. WEIL, A. J. (1960), *Science*, **131**, 1040.
27. WEISMAN, A. (1939), *Amer. J. Obstet. Gynec.*, **38**, 313.
28. WEYENETH, R. (1950), *Schweiz. Rdsch. med.*, **39**, 397.
29. WHITE, W. E. (1933), *Proc. roy. Soc. B.* **113**, 544.
30. YOUNG, W. C. (1929), *J. Morph.*, **48**, 475.

Für Ausgabe und Herstellung verantwortlich

GYÖRGY BERNÁT

Direktor des Verlages und der Druckerei der Ungarischen
Akademie der Wissenschaften, Budapest

✕

Verantwortlicher Redakteur

ILDIKÓ TÖRÖK

✕

Technischer Redakteur

KÁROLY SZÖLLŐSY

© *Akadémiai Kiadó, Budapest 1964*

AK 501 g 6468

Druckerei der Ungarischen Akademie der Wissenschaften, Budapest

PRINTED IN HUNGARY

BEREITS ERSCHIENEN
IN DER REIHE
SYMPOSIA BIOLOGICA
HUNGARICA

Band 1

**Hypothalamus-Hypophysensystem und
Neurosekretion**

(Symposium in Tihany, Juni 1958)

Herausgegeben von I. TÖRÖ

Vergriffen

Band 2

Makrophagen und Phagozytose

(II. Internationales Histologensymposium,
Budapest, September 1959)

Herausgegeben von I. TÖRÖ

154 Seiten — 119 zum Teil mehrfarbige
Abbildungen — 17 × 24 cm
Ganzleinen

Band 3

Regeneration and Wound Healing

(Symposium in Budapest, November 1961)

Herausgegeben von GY. SZÁNTÓ

148 Seiten — Zahlreiche Abbildungen
17 × 24 cm — Ganzleinen

IN VORBEREITUNG
IN DER REIHE
SYMPOSIA BIOLOGICA
HUNGARICA

Band 5

Modern Trends in Neuromorphology

In memoriam Michaeli Lenhossék
1863—1937

(Symposium in Budapest, 5—6. Juli 1963)

Herausgegeben von

J. SZENTÁGOTHAJ

Band 6

**Proceedings of the Symposium on
Bacterial Transformation and
Bacteriocinogeny**

Budapest 1963

Herausgegeben von B. GYÖRFFY

Vertrieb

KULTURA
Budapest 62
Postfach 149

