

Aus dem Institut für gerichtliche Medizin der Universität München
(Vorstand: Prof. Dr. W. LAVES).

Hyaluronidase und Zeugungsfähigkeit.

Von

WOLFGANG LAVES.

Mit 3 Textabbildungen.

(*Eingegangen am 15. Dezember 1947.*)

Das frisch entleerte Ejaculat eines zeugungsfähigen Mannes hat gewöhnlich eine sulzig gelatinöse Beschaffenheit. Im mikroskopischen Bilde zeigen die Spermatozoen nur geringe Beweglichkeit. Läßt man das Ejaculat jedoch einige Minuten stehen, so verflüssigt es sich vollständig und die Motilität des Spermatozoen erscheint wesentlich gesteigert. Bei Oligospermie beansprucht die Viscositätsänderung längere Zeit, während sie bei Azoospermie oft völlig auszubleiben pflegt.

Die Verflüssigung des normalen Ejaculates beruht auf der Anwesenheit eines von den Spermatozoen an das Medium abgegebenen Enzyms, der *Hyaluronidase*. In der einschlägigen Literatur wird dasselbe auch als mucinspaltendes Ferment des Hodens, als Duran Reynals- oder Diffusionsfaktor, bzw. spreading factor beschrieben.

Es handelt sich um eine Mucopolysaccharase, welche Hyaluron- und Chondroitinschwefelsäure hydrolysiert, wobei äquimolekulare Mengen von N-Acetylglucosamin und Glucuronsäure sowie andere reduzierende Substanzen (Oligosaccharide) als Reaktionsprodukte entstehen (L. HAHN, HAAS).

Das Ferment kommt außer im Hoden auch in zahlreichen pathogenen Bakterien, im Bienengift und in Schlangentoxinen sowie in anderem biologischen Material vor. Das menschliche Serum enthält einen Hemmungsfaktor, welcher die Hyaluronidase teilweise inaktiviert; die Verhältnisse scheinen jedoch recht komplex zu sein, da es andere Faktoren gibt, die ihrerseits den Abbaufaktor blockieren (Proinvasin, Antiinvasin I und II, HAAS).

Die *biologische Bedeutung* der Hyaluronidase ist nach den bisher vorliegenden Mitteilungen sehr vielseitig. Zunächst bewirkt das Enzym die Verflüssigung des Liquor folliculi und die Absprengung der Zellen der Corona radiata des Eies und ermöglicht dadurch seine Befruchtung (ROTHSCHILD).

Die Bakterienhyaluronidase (spreading factor) beeinflußt das Eindringen und die Verbreitung pathogener Mikro-Organismen in Geweben. Das hyaluronsäurehaltige Bindegewebe bildet eine physiologische

Schranke gegen das Eindringen körperfremder Substanzen. Durch die Bakterienhyaluronidase wird die Hyaluronsäure hydrolysiert und damit die Verbreitung von Erregern im Organismus begünstigt (spreading effect).

Es sei schließlich angeführt, daß Hyaluronidase als Antigen wirkt. Durch Immunisierung mit diesem Ferment läßt sich eine bis zu einem Jahre bestehende Unfruchtbarkeit bei weiblichen Versuchstieren (Ratten) erzielen (LEONARD und KURZROCK). Versuche, die C. I. ESCUDER mit Spermaextrakten zur biologischen Sterilisierung der Frau (Contraception) weiter ausbaute. Natriumsalicylat hemmt die Wirkung des Enzyms. Nach Entfernung der Salicylsäure durch Dialyse wird das Ferment wieder wirksam.

Zum Nachweis der Enzymwirkung bedient man sich verschiedener Verfahren. Hierzu gehört die Beobachtung der Viscositätsänderung von Testlösungen der Hyaluronsäure, z. B. aus WHARTONScher-Sulze, Synovia oder aus dem Corpus vitreum von Rinderaugen. Das gebildete N-Acetylglucosamin wird nach der Methode von MORGAN und ELSON oder als Glucose nach HAGEDORN-JENSEN bestimmt. Schließlich hat HAHN eine kolorimetrische Farbreaktion unter Verwendung von Paradiaminobenzaldehyd (Violettfärbung) beschrieben. Von mir wurde ein histologisches Verfahren angegeben. Dieses beruht auf der Verfolgung der Abnahme der Basophilie von Gefrierschnitten hyalinen Knorpels bei Einwirkung von Hyaluronidase aus Stierhoden. Die Veränderung der elektrostatischen Eigenschaften der Knorpelbestandteile wird durch den Abbau der Chondroitinschwefelsäure bedingt. Das Verfahren kann auch zum Nachweis der Hyaluronidase in Ejaculaten dienen.

Aus zahlreichen Versuchen mögen die folgenden Beispiele als Belege dienen:

Frische Ejaculate die teils normalen, teils fehlenden Spermatozoengehalt aufweisen, werden mit 0,9%iger NaCl-Lösung verdünnt. Jede der Proben wurde dann in 2 Portionen geteilt und mit 0,2 m/Acetat auf p_{H} 5 eingestellt. Je eine Probe wurde auf eine 0,25 m/Na-Salicylatkonzentration gebracht. In allen 4 Proben erfolgte dann die Suspension von je 10—15 Gefrierschnitten frischen hyalinen Rippenknorpels. Als Kontrolle dienten Ansätze mit Acetat-Kochsalzlösungen und Knorpelschnitten ohne Spermazusatz.

Nach Abspülen der aus den Proben entnommenen Gefrierschnitte erfolgt ihre Färbung mit m/500 Lösungen von Methylenblau, die auf p_{H} -Bereiche von 1—8 mit n/10 HCl und Puffergemischen eingestellt werden (PISCHINGER).

Bei der makroskopischen Betrachtung der fünf Färbungsserien ergab sich folgender Befund (Abb. 1):

a) Knorpelschnitte, die keiner Spermawirkung unterworfen waren, ebenso diejenigen nach Inkubation mit spermatozoenfreiem Ejaculat, schließlich die Schnitte, bei welchen das normalen Spermatozoengehalt aufweisende Ejaculat mit 0,25 m Na-Salicylat versetzt worden war,

zeigten das von A. PISCHINGER beschriebene Verhalten des raschen Färbungsanstiegs bereits im stark sauren Bereich.

b) Die mit normalen Ejaculaten vorbehandelten Schnitte ließen dagegen in den untersuchten H^- -Konzentrationen jede stärkere Farbadsorption vermissen.

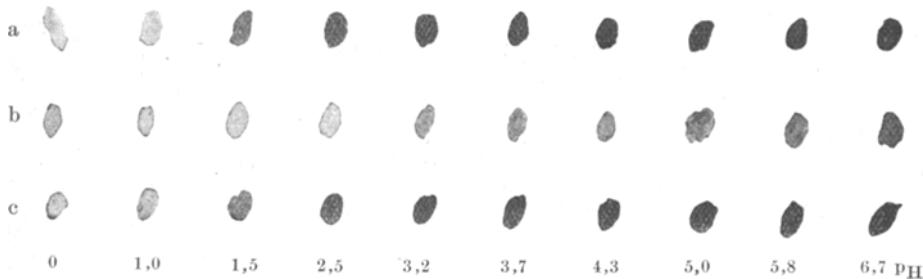


Abb. 1. Die Farbstoffadsorption von Gefrierschnitten kindlichen Rippenknorpels bei Färbung mit acidimetrisch abgestuften m/500 Methylenblaulösungen. Serie a. Kontrolle mit unbehandelten Schnitten. Serie b. Nach Vorbehandlung mit normalem Sperma. Serie c. Nach Vorbehandlung mit Sperma bei Azoospermie oder nach Vorbehandlung mit normalem Sperma + 0,25 m Na-salicylat.

Diese Färbungsergebnisse wurden mikroskopisch mit einem Okularphotoelement in Schaltung mit einem hochempfindlichen Galvanometer ausgewertet. Die folgenden Kurven (Abb. 2) zeigen das Verhalten der Lichtadsorption in Prozent.

Nach A. PISCHINGER entspricht etwa der Mittelwert der p_H -Bereiche des raschen Färbungsanstieges dem I. P. des betreffenden Gewebskolloides. Aus den Kurven würde sich somit der Umladebereich des Gesamtknorpels bei Behandlung mit aktivem Sperma + Natriumsalicylat, sowie der des Knorpels nach Einwirkung eines Ejaculates bei Azoospermie bei p_H 1,5 liegen. Dieser Wert entspricht den Angaben von A. PISCHINGER. Durch Spermahyaluronidase wird dagegen, der Umladebereich soweit nach der alkalischen Seite verschoben, daß er in den verwendeten C_H^- -Bereichen nicht ermittelt werden konnte.

Das Wesen dieser Reaktion wird verständlich, wenn man sich an die mathematische Definition des isoelektrischen Punktes eines

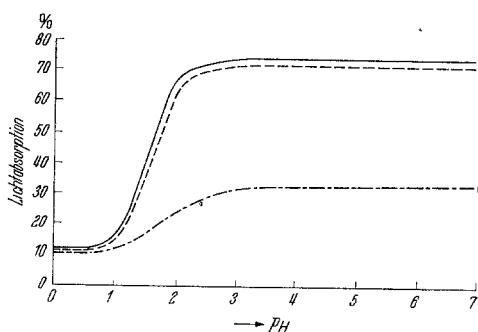


Abb. 2. Das Verhalten der Lichtabsorption der 3 Schnittserien der Abb. 1. Messung mit einem Okularphotoelement bei 40facher Vergrößerung.

einfachen Ampholyten erinnert, und hyaliner Knorpel sei in diesem Zusammenhange als solcher betrachtet. Diese entspricht jener Wasserstoffionenkonzentration, bei welcher die positiven und negativen Elektrolytionen in der gleichen Menge vorliegen. L. MICHAELIS hat aus den Dissoziationsgleichungen folgende Formel abgeleitet:

$$I = \sqrt{\frac{k_a}{k_b} \cdot k_w}$$

wobei k_a die Säuredissoziationskonstante, k_b die Basendissoziationskonstante, k_w die Wasserkonstante bedeuten.

Die normale Basophilie der Territorial- und Interterritorialsubstanzen des Knorpels beruht auf ihrem Gehalt an Chondroitinschwefelsäure. Da Hyaluronidase dieselbe

hydrolytisch abbaut, muß in obige Formel k_a kleiner und mithin die C_H des Umladebereiches abnehmen, was die Versuche be- weisen. Sie sind somit ein ein- drucksvolles Beispiel für die Be- ziehungen zwischen *chemischen Veränderungen* eines Gewebskolloides und seinem Verhalten ge- genüber einem nicht umladbaren Farbstoff, wie sie W. LAVES bei der Gewebsautolyse und vitalen regressiven Zellveränderungen nach-

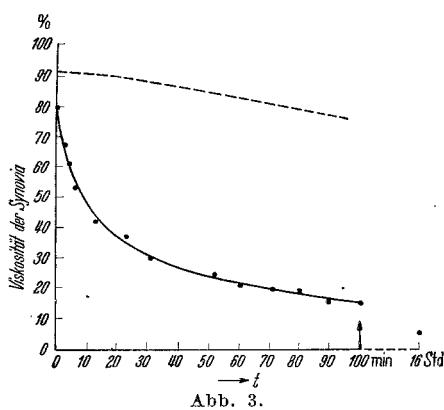


Abb. 3.

gewiesen hat. Auf die mikroskopisch erkennbaren Folgen des Abbaues der Chondroitinschwefelsäure im Knorpelgewebe (Demaskierung der fibrillären Struktur ?) soll hier nicht eingegangen werden.

Für rasche Bestimmungen der Hyaluronidase in fraglichen Ejaculaten kann die Beobachtung der Verflüssigung der Synovia dienen, wenn man sich nicht Hyaluronsäure in gereinigter Form herstellen will. Außer durch den Gehalt an der hochpolymerisierten Kohlehydratsäure wird die Viscosität der Gelenkflüssigkeit auch durch geringe Proteink Mengen bedingt. Wir sammeln Synovia aus Kniegelenken verunglückter oder plötzlich verstorbener Personen. Aus einem Gelenk gewinnt man 0,2—3 ccm, die im Kühlschrank eingefroren aufbewahrt werden. Zur Untersuchung wird 1 ccm mit 1—2 Tropfen des fraglichen Ejaculates versetzt und bei Zimmertemperatur gut durchgeschüttelt. Nach 5—20 Min. ist bereits eine weitgehende Verflüssigung eingetreten, während sich die Viscosität entsprechender Kontrollen nicht ändert.

Zur Viscositätsmessung wird die Probe in eine in zwei Abständen markierte Capillarpipette mit unten abgeschrägter Öffnung aufgesaugt und das Durchschneiden des Flüssigkeitsmeniscus während des

Ablaufens an der oberen und unteren Markierung der Pipette mit der Stoppuhr verfolgt. (Die untere Öffnung muß in das Reaktionsgemisch eintauchen.) Die folgende Kurve zeigt das Ergebnis eines derartigen Versuches. Eine völlige Verflüssigung bis auf die Viscosität des Wassers wird offenbar wegen des Eiweißgehaltes der Versuchsansätze auch nach längerer Zeit nicht erreicht (Abb. 3).

Entsprechende Versuche mit einem Ejaculaten bei Azoospermie fallen negativ aus; bei Oligospermie ist die Verflüssigung der Synovia verzögert.

Der Nachweis der Hyaluronidase hat für die gerichtliche Feststellung der Zeugungsfähigkeit eines Mannes eine gewisse praktische Bedeutung. Zunächst erscheint es wichtig, daß die zu untersuchenden Männer stets ein frisches Ejaculat liefern. Schon das oben erwähnte Verhalten der Viscosität bildet ein Identifizierungszeichen. Ferner gibt uns die Beobachtung des Eintretens oder des Ausbleibens der Verflüssigung Hinweise auf das vermutliche Vorhandensein oder Fehlen von Spermatozoen, da der Gehalt an Hyaluronidase in direkter Beziehung zur Zahl der Samenfäden zu stehen scheint (JOEL und EICHENBERGER, WERTHESSEN). Wir haben diese Befunde in zahlreichen Fällen bestätigt und erwähnen daher im Untersuchungsbericht stets auch das Verhalten der Viscosität.

Zur Untersuchung mitgebrachte, z. B. in Condomen aufgefangene Ejaculate sind gewöhnlich verflüssigt und verunreinigt, auch kann der mikroskopische Nachweis der Spermatozoen Schwierigkeiten begegnen.

Findet man in einem derartigen Untersuchungsobjekt Hyaluronidase, so wird dasselbe nicht nur als Sperma identifiziert, sondern damit auch der Hinweis gegeben, daß bei dem Spender mit großer Wahrscheinlichkeit Normo- oder Oligospermie besteht.

Bekanntlich beruhen die meisten chemischen Verfahren zum Spermennachweis auf Reaktionen mit Ejaculatsbestandteilen, die aus den ableitenden Samenwegen, der Prostata und aus den Samenblasen, stammen. Demgegenüber ist die Hyaluronidase an die Anwesenheit der Spermatozoen selbst gebunden. Ihr Nachweis hat daher die Bedeutung einer spezifischen Spermareaktion, zumal die Differentialdiagnose gegenüber einer Bakterien Hyaluronidase enthaltenden Flüssigkeit, in der Praxis kaum in Frage kommt.

Die Bestimmung des Enzyms erscheint uns eine berücksichtigenswerte Ergänzung der forensischen Untersuchung auf Zeugungsfähigkeit zu bilden.

Literatur.

CHAFFEE, E. and M. H. DAWSON: *J. exper. Med. (Am.)* **71**, 137 (1940). — CHAIN, E. and E. S. DUTHIE: *Nature (Brit.)* **144**, 977 (1939). — CLAUDE, A.: *Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.)* **43**, 684 (1940). — CLAUDE, A. and F. DURAN-REYNALS: *J. exper. Med. (Am.)* **65**, 661 (1937). — DURAN-REYNALS, F.: C. r.

Soc. Biol. **99**, 6 (1928). — Ann. Inst. Pasteur., Par. **57**, 597 (1936). — ESCUDER, C. J.: An. Fac. Med. Montev. **21**, 889 (1936). — RONAS Ber. **103**, 114 (1937). — FAVILLI, G.: Boll. Ist. sieroter. milan. **19**, 481 (1940). — HAAS: Ciem. Abstr. **19**. 7. — HAHN, L.: Biochem. Z. **315**, 83 (1943); **318**, 123 (1947). — HENLE, W., G. HENLEE and L. A. CHAMBERS: J. exper. Med. (Am.) **68**, 335 (1938). — HOFFMAN, D. C.: J. exper. Med. (Am.) **53**, 387 (1931). — JOEL, C. A. u. E. EICHENBERGER: Schweiz. med. Wschr. **1945**, 601. — KUHN, R. u. K. WALLENFELS: Ber. dtsch. chem. Ges. **72**, 1407 (1939). — KURZROK, R. u. MILLER: Amer. J. Obstetr. **15**, 56 (1928). — LAVES, W.: Klin. Wschr. **1948**. — LEONARD, S. and R. KURZROK: Endocrinology (Am.) **37**, 171 (1945). — LETTERER, E.: Über die epitheliale und mesodermale Schleimbildung. Leipzig: S. Hirzel 1932. — McCLEAN, D.: J. Path. a. Bacter. **33**, 1045 (1930); **42**, 477 (1936). — Biochem. J. (Brit.) **35**, 159 (1941). Aus: Chem. Zbl. **1942** II, 1582. — McCLEAN, D. and C. W. HALE: J. exper. Med. (Am.) **145**, 867 (1940). — McCLEAN, D. and J. W. ROWLANDS: Nature (Brit.) **150**, 627 (1942). — MEYER, K. and E. CHAFFEE: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **48**, 487 (1940). — J. biol. Chem. (Am.) **140**, 91 (1941). — Chem. Zbl. **1942** I, 2662. — MEYER, K., R. DUBOS and E. N. SMYTH: J. biol. Chem. (Am.) **118**, 71 (1937). — MEYER, K. and J. W. PALMER: J. biol. Chem. **107**, 629 (1934); **114**, 689 (1936). — MEYER, K., J. W. PALMER and M. H. DAWSON: J. biol. Chem. (Am.) **128**, 319 (1939). — MORGAN, W. T. J. and D. McCLEAN: J. Soc. chem. Ind. **51**, 912 (1932). — ROBERTSON, ROPES and BAUER: J. biol. Chem. (Am.) **133**, 261 (1940). — ROMANO, M.: Pathologica (It.) **31**, 253 (1939). Ref. Chem. Zbl. **1906** II, 1939. — ROTHSCHILD, LORD: Brit. med. J. **1947**. — SCHMIDT, H.: Erg. Hyg. usw. **24**, 365. — WALLENFELS, K.: Z. angew. Chem. **54**, 234 (1941). — WERTHESSEN, N. T., S. BERMAN, B. E. GREENBERG and S. L. GARGILL: J. Ur. (Am.) **54**, 565 (1945).