Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
8. Jg., S. 504—506, September 1970

Immunelektrophoretische Untersuchung der α -Naphthylacetat spezifischen Esterase im menschlichen Spermaplasma

Von T. EWREW

*Aus dem Lehrstuhl für allgemeine Biologie an der Medizinischen Hochschule
(Leiter: Prof. Dr. R. Popivanow) Sofia, Bulgarien*

(Eingegangen am 20. April 1970)

Nach dem immunelektrophoretischen Verfahren, kombiniert mit enzymchemischer Reaktion, wurden 50 Spermaproben von Probanden mit Normospermie (26), Oligospermie (14), Nekrospermie (3) und Azoospermie (7) untersucht. Bei sämtlichen Proben konnten je 2 Präzipitationslinien mit α -Naphthylacetat spezifischer Esteraseaktivität — anodisch und kathodisch — nachgewiesen werden. Diese Präzipitationslinien waren auch in Extrakten von Textilproben nachzuweisen, die in Spermaplasma 30 Tage bei 25° getränkt lagen. In Blutserum, Vaginalexkret, Zervixsekret, Urin, Speichel und Nasensekret des Menschen sowie im Spermaplasma anderer Säuger (Stier und Hammel) sind mit Anti-Human-Plasma und Antispermplasma-Serum nach derselben Methode solche Präzipitationslinien nicht nachweisbar.

Es wird die Ansicht geäußert, daß das kombinierte Verfahren zur Untersuchung der Enzyme im menschlichen Spermaplasma in besonderen Fällen der gerichtsmedizinischen Expertise angewandt werden kann.

Immunelectrophoretic studies on the α -naphthyl-acetate-specific esterase in human sperm plasma

50 Sperm samples from probands with normospermia (26), oligospermia (14), necrospermia (3) and azoospermia (7) were studied by immunelectrophoresis combined with enzyme chemical reactions. All samples showed 2 precipitation bands, one anodic and one cathodic, each with α -naphthyl-acetate-specific esterase activity. These bands could also be shown in extracts of small pieces of cloth soaked and in sperm plasma left for 30 days at 25°. Using anti-human and anti-sperm plasma serum, it was not possible to demonstrate these bands in the human biological fluids used as controls, i. e., blood serum, vaginal extract, cervix extract, urine, saliva, nasal secretion, or in the sperm plasma of other mammals (bull and ram).

It is proposed that this combined method for the investigation of enzymes in human sperm plasma could be used in special cases for forensic medical purposes.

Bei der Immunelektrophorese von menschlichem Spermaplasma beobachtet man 10—12 Präzipitationslinien, von denen sechs von QUINLIVAN (1) immunelektrophoretisch identifiziert wurden. BECKMAN und KJESSLER (2) finden bei einfacher Elektrophorese von menschlichem Spermaplasma im Stärkegel einige Zonen mit Esteraseaktivität. Wir versuchten festzustellen, welche der Spermaplasma-Proteine eine α -Naphthylacetat spezifische Esteraseaktivität besitzen, indem wir das immunelektrophoretische Verfahren mit enzymchemischer Reaktion kombinierten. Eine ähnliche Kombination hat URIEL (3) bei der Untersuchung einiger Fermente im Blutserum des Menschen angewandt.

Mit diesem Verfahren überprüften wir ebenfalls die zeitliche und die Thermostabilität der Spermaplasma-Esterasen.

Material und Methoden

Wir gewannen präzipitierende Anti-Sera gegen Spermaplasma durch Immunisation von Kaninchen mit einer Mischung von Spermaplasmen gesunder Spender nach dem Verfahren von SHULMAN (4). Drei der immunisierten Tiere zeigten einen Präzipitationstiter über 1:20000 und wurden entblutet.

Es wurden Spermaproben von Menschen mit Normospermie ($n = 26$), mit Oligospermie ($n = 14$), mit Nekrospermie ($n = 3$) und mit Azoospermie ($n = 7$) untersucht. Wir zentrifugierten die Ejakulate 20 Min. bei 10000 U./Min. Die Überstände (klares Spermaplasma) wurden sofort oder nach Aufbewahrung bei -15° untersucht. Die Sedimente (Spermatozoen) wurden dreifach mit physiol.

NaCl-Lösung gewaschen. Dann homogenisierten wir die Spermatozoen durch sechsmaliges Gefrieren mit flüssigem Stickstoff und bewahrten sie bis zur Untersuchung bei -15° auf.

Zur Kontrolle entnahmen wir Blutserum, Speichel, Nasensekret und Urin von zwei gesunden Spendern sowie Zervixsekret und Vaginalsekret von 8 Frauen.

Methodik

Immunelektrophorese: Sämtliches Untersuchungsmaterial zentrifugierten wir 20 Min. bei 5000 U./Min. in einer Kühlzentrifuge bei 4° . Die Überstände unterzogen wir der Immunelektrophorese nach dem mikromodifizierten Verfahren von GRABAR und BURTIN (5). Nach Hervortreten der Präzipitationslinien spülten wir die Träger in bis 4° abgekühlter physiol. NaCl-Lösung (2—3 l) und trockneten sie unter Filterpapier mit einem Ventilator.

Die enzymchemische Reaktion für Esterasen führten wir nach LAWRENCE (6) durch, wobei wir α -Naphthylacetat und Tetrazolium-o-dianisidin (Fast Blue B) benutzten. In einigen Fällen färbten wir zusätzlich mit Amidoschwarz.

Die zeitliche und die Thermostabilität der Spermaplasma-Esterasen überprüften wir auf folgende Weise: kleine Stücke von Baumwoll-, Woll- und Kunstfaser-Textilien trankten wir mit 1 ml/ Spermaplasma und bewahrten sie im Thermostat bei 25° 10—30 Tage auf. Daraus gewannen wir mit 1 ml/ physiol. NaCl-Lösung Extrakte, die nach obigem Verfahren untersucht wurden.

Ergebnisse und Besprechung

Bei sämtlichen 50 Proben, davon 26 Probanden mit Normospermie, 14 mit Oligospermie, 7 mit Azoospermie und 3 mit Nekrospermie, konnten je zwei immuno-

elektrophoretische Linien mit α -Naphthylacetat spezifischer Esteraseaktivität nachgewiesen werden: eine im anodischen Bereich mit elektrophoretischer Beweglichkeit der α_1 - und α_2 -Globuline und die zweite im kathodischen Bereich mit diffusen Grenzen, die sich von der Zone der Makroglobuline bis IgG ausdehnt (Abb. 1).

Abb. 1

Immunelektrophorese des menschlichen Spermaplasmas gegenüber Antispermaplasma-Serum von Kaninchen. Zuerst wurde Esteraseaktivität dargestellt und darauf wurde die oberste Startlinie zusätzlich mit Amidoschwarz gefärbt

Die Linien mit Esteraseaktivität entsprechen keinem einzigen der Präzipitationslinien der Kontrolluntersuchungen, die nur mit Amidoschwarz gefärbt sind. Dies begründet die Annahme, daß bei der gewöhnlichen Färbung mit Amidoschwarz nicht alle Streifen sichtbar werden, sondern nur jene, die eine größere Menge Protein enthalten. Zur Unterstützung dieser Annahme dient die Tatsache, daß bei doppeltem Färben (für Esterasen und Proteine) die Präzipitationsstreifen mit Esteraseaktivität (Abb. 1) sich zusätzlich nicht von Amidoschwarz in blau färben lassen.

Der anodische Streifen mit Esteraseaktivität zeigt bei manchen Probanden eine stärkere elektrophoretische Beweglichkeit, entsprechend der α_1 -Globuline, bei anderen befindet er sich näher an der Startlinie, etwa in der Zone der α_2 -Globuline und bei dritten Probanden ist er beträchtlich lang und zieht über beide Bereiche (Abb. 2). Wir konnten dabei keine Abhängigkeit zwischen dem untersuchten Ejakulat (normospermisch, oligospermisch, nekrospermisch oder azospermisch) und den beschriebenen Varianten nachweisen. Diese phänotypen Unterschiede sind wahrscheinlich auf den genetischen Polymorphismus zurückzuführen, bedingt von einem allelen Genpaar. Da Familienuntersuchungen unmöglich waren, müssen wir davon absehen, diese einfache Hypothese vorzuschlagen.

In den Homogenaten von Spermatozoen von 10 der gesunden Spender konnte nur ein kathodischer Streifen mit Esteraseaktivität nachgewiesen werden (Abb. 3) und, wie aus unseren Untersuchungen mit doppelter Diffusion in Agar hervorgeht, ist dieser gemeinsam für das Spermaplasma und für die Spermatozoen.

Im Blutserum und im Speichel, in den Nasensekreten, in Urin und Zervixsekret, sowie in den Vaginalsekreten konnten keine Präzipitationsstreifen mit Esteraseaktivität festgestellt werden, trotzdem die meisten von ihnen mehrere Präzipitationsstreifen gemeinsam mit den Proteinfractionen des Spermaplasmas aufweisen. Dies begründet die Annahme, daß der festgestellte anodische Streifen mit α -Naphthylacetat spezifischer Esterase-

Abb. 2

Immunelektrophoresen der Spermaplasmen von 18 Probanden gegenüber Antispermaplasma-Serum von Kaninchen. Die anodische Esteraselinie zeigte bei einigen der untersuchten Probanden eine Beweglichkeit der α_1 -Globuline, bei anderen der α_2 -Globuline und bei dritten umfaßt er beide Bereiche. Im sechsten und siebten Kanal sind Extrakte von Textilien dargestellt, die in Spermaplasma getaucht und 30 Tage bei 25° aufbewahrt waren

Abb. 3

Immunelektrophorese von Spermaplasma, Homogenat von gewaschenen Spermatozoen und Blutserum eines gesunden Spenders. Das Spermaplasma zeigt kathodische und anodische Präzipitationslinien mit Esteraseaktivität und das Spermatozoenhomogenat nur eine kathodische Linie. Das Blutserum weist keine Präzipitationslinie mit Esteraseaktivität auf.

aktivität nur für das Spermaplasma kennzeichnend ist. Bei gekreuzter Untersuchung des Spermaplasmas von anderen Säugern (Stier und Hammel) werden keine Präzipitationsstreifen mit Esteraseaktivität gefunden, d. h. mit diesem Verfahren werden nur die artspezifischen Esterasen entdeckt.

Bei der Untersuchung der Extrakte von Textilien, die mit Spermaplasma getränkt waren, stellten wir mit demselben Verfahren fest, daß die Spermaplasma Linien mit Esteraseaktivität durch eine für die meisten Enzyme ungewöhnliche zeitliche und Thermostabilität gekennzeichnet sind. Die getrockneten Proben, die 10 bis

30 Tage bei 25° stehen gelassen waren, zeigten eine deutlich ausgeprägte kathodische Linien und eine noch bemerkbare anodische Esteraselinie.

Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse und des Umstandes, daß die Linien mit Esteraseaktivität in keinen anderen biologischen Flüssigkeiten des Menschen zu finden sind, vertreten wir die Ansicht, daß dieses kombinierte Verfahren der immunoelktrophoretischen Untersuchung von spermoplasmatischen α -Naphthylacetat spezifischen Esterasen in einigen Sonderfällen der gerichtsmedizinischen Expertise empfohlen werden kann.

Literatur

1. QUINLIVAN, W. L. G., Arch. Biochem. Biophysics 127, 1—3 (1968). — 2. BECKMAN, L. und B. KJESSLER, Acta genet., Basel 18, 55—60 (1968). — 3. URIEL, J., Ann. N. Y. Acad. Sc. 103, 936 (1963). — 4. SHULMAN, S. und P. BROUNSON, J. Reprod.

Fert. 18, 481 (1969). — 5. GRABAR, P., Burtin, Analyse immunoélectrophorétique, Masson et Cie, Paris (1960). — 6. LAWRENCE, S. H., in: The Zymogram in Clinical Medicine, Charles C. Thomas Publisher, Springfield, USA (1964).

Dr. med. T. Ewrew
Yantra 1
Sofia, Bulgarien