

ÜBER DIE FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNG MENSCHLICHER SPERMIIEN NACH FLUOROCHROMIERUNG MIT AKRIDINORANGE

Von DR. LEOPOLD STOCKINGER
(Histologisch-Embryologisches Institut der Uni-
versität Wien; Vorstand Prof. V. Patzelt)

Die Bedeutung der Spermauntersuchung ist durch die Erkenntnis, daß für die Kinderlosigkeit vieler Ehen auch der männliche Faktor verantwortlich ist, stark in den Vordergrund des Interesses gerückt. Wie weit allein Zahl, Form und Bewegungsfähigkeit der Samenfäden bei sonst normaler Beschaffenheit des Ejakulates für die Beurteilung der Befruchtungsfähigkeit ausschlaggebend sind, ist meist schwer zu beurteilen. Allein schon die enorm hohe Zahl der Samenfäden eines Ejakulates weist darauf hin, daß die Natur diesen Überschuß deshalb produziert, weil im Rahmen der natürlichen Auslese wahrscheinlich doch nur ein kleiner Prozentsatz wirklich vollwertig und befruchtungsfähig ist. Die Beobachtung, Zählung usw. des ungefärbten lebenden Spermiums bildet die Grundlage der derzeit üblichen Spermauntersuchung. Auf Anregung von Prof. PATZELT versuchte ich nun fluoreszenzmikroskopisch nach Vitalfärbung oder besser Vitalfluorochromierung, mit einem den Lebenszustand der Samenzellen nur wenig beeinflussenden Fluorochrom unter verschiedenen Bedingungen die Samenfäden zu untersuchen. STRÜGGER weist in einer Arbeit auf ähnliche Untersuchungen an Ziegenbocksperma hin und behauptet dabei die Unterscheidungsmöglichkeit lebender und toter Spermien. Die Nachprüfung dieser Ergebnisse an menschlichem Material sowie die Beurteilung der praktischen Anwendbarkeit dieser Methode waren der unmittelbare Anlaß zu dieser Untersuchung.

Als Untersuchungsmaterial verwendete ich hauptsächlich postmortal entnommenen Preßsaft aus Hoden bzw. Nebenhoden, vergleichsweise aber auch frisches Ejakulat. Nach Angaben von PATZELT können die Spermien noch mehrere Tage nach dem Tode bewegungsfähig, also am Leben sein.

Die Hoden bzw. Nebenhoden wurden ausnahmslos wenige Stunden nach dem Tode aus Leichen der verschiedensten Altersstufen entnommen und die Spermien zum Teil in frischem, zum Teil in konserviertem Zustand untersucht.

Zur Fluorochromierung verwendete ich Akridinorange, verdünnt in Aqua destillata in Konzentrationen von 1 1000 bis 1 100 000, zum Teil auch verdünnt in Pufferlösungen der verschiedenen pH-Stufen. Nach Angaben von HÖFLER sind basische Vitalfarbstoffe bei alkalischer Reaktion im allgemeinen als undissoziierte Moleküle, im sauren Bereich aber zum Teil ionisiert vorhanden. Für Akridinorange gibt er jedoch an, daß dieser Farbstoff bis zu pH 11 auch in ionisierter Form vorliegt. Das untersuchte Material wurde im Überschuß der Farblösung beobachtet.

Im einzelnen zeigte es sich, daß sowohl beim Leichenmaterial als auch am frischen Ejakulat bei der Verdünnung von 1 : 1000 die Spermienköpfe fast ausnahmslos kupferrot erscheinen, ohne Rücksicht auf den Zeitpunkt der Untersuchung. Mit steigender Verdünnung des Fluorochroms finden sich kontinuierliche Übergänge der Farbnuancen bis zum leuchtenden Gelbgrün. Schon bei Verdünnungen um 1 : 10 000 überwiegen bei weitem die gelblichen und gelbgrünlichen Farbstufen, und in Verdünnungen über 1 : 20 000 habe ich ausschließlich nur gelbgrünlich fluoreszierende Spermien gesehen. Diese Untersuchungen zeitigten sowohl am ganz frischen als auch an bis zu 90 Stunden unter den verschiedensten Bedingungen gelagertem Material dasselbe Ergebnis. Auch Material, das 24 Stunden in 10% Formollösung eingelegt war, und Ejakulat, das mehrere Stunden Formoldämpfen ausgesetzt war, verhielt sich nicht anders. Ebenso Spermien in Gefrier- und Paraffinschnitten.

Die genannten Angaben erheben zwar nicht den Anspruch auf Vollständigkeit der einzelnen Untersuchungsreihen, jedoch zeigt auch diese kurze Zusammenfassung meiner Untersuchungsergebnisse deutlich, daß man auf Grund des angegebenen Verhaltens keine sicheren Schlüsse auf den Lebenszustand der Spermien bzw. keine sichere Unterscheidung zwischen lebenden und toten Spermien treffen kann. Ähnliche Untersuchungsreihen habe ich auch in gepufferten Farbstofflösungen von pH 4—9 durchgeführt und auch dabei im wesentlichen dieselben Resultate erzielt. Nur bezüglich der Farbintensität erhielt ich um pH 8 bessere Resultate als im übrigen pH -Bereich.

Bezüglich des morphologischen Verhaltens der Spermien sind im fluoreszenzmikroskopischen Bild weniger histologische Feinheiten erkennbar als im gewöhnlichen Nativbild. Meist ist überhaupt nur der Kopf der Spermien erkennbar und zeigt eine ziemlich homogene Farbe. Lediglich im vorderen Teil des Kopfes fiel mir sowohl an den kupferrot als auch in allen Farbübergängen bis grüngelblich gefärbten Spermienköpfen eine, besonders in der Flächenansicht deutlich erkennbare, weniger stark fluoreszierende Vakuole auf. Sie liegt im vorderen abgeplatteten Teil des Kopfes und wird von einem stärker fluoreszierenden Rand begrenzt. Auch STIEVE weist bei der Beschreibung der reifen Spermatozyten auf eine Vakuole hin, die er nur in der Flächenansicht beobachtet hat. MARCUS hat diese Vakuole auch schon im ultravioletten Licht beobachtet. Sicherlich spielt bei dieser Aufhellung — „Vakuole“ — auch die Abplattung des Kopfes eine große Rolle. Der Schwanz der Spermien fluoresziert auch bei hohen Farbstoffkonzentrationen fast nie im frischen Zustand, nur bei zum Teil ausgetrockneten Präparaten tritt eine schwache Fluoreszenz auf.

Ein Versuch, das verschiedene Verhalten der Spermien in den verschiedenen Farbstoffkonzentrationen aufzuklären, hat mich bisher noch zu keinem Ziel geführt. Eine ähnliche Fluoreszenz hat HÖFLER an Pflanzenzellen erzielt und er nimmt an, daß gelbgrünliche Färbung durch Verbindung der endosmierenden Farbstoffmoleküle mit zelleigenen Stoffen, kupferrote Färbung aber durch Speicherung von Farbstoffkationen zustande kommt. Nach

seinen Angaben ist es jedoch nur molekularem Farbstoff möglich, lebendes Plasma der Pflanzenzellen zu permeieren, meist aber nicht den elektrisch geladenen lipoidunlöslichen Ionen. Die Zellkerne sowohl lebender als auch toter Pflanzenzellen beschreibt HÖFLER mit einer einzigen Ausnahme gelbgrün gefärbt. Auch eine Parallele mit dem färberischen Verhalten der Pflanzenzellen führt somit zu keinem Ergebnis, da der Samenfaden zum Großteil nur aus Kernsubstanzen aufgebaut ist und daher auch innerhalb der tierischen und menschlichen Zellen eine Sonderstellung einnimmt. Die Unterscheidung lebender und toter Pflanzenzellen beruht aber dagegen auf dem fluoreszenzmikroskopischen Verhalten vor allem des Plasmas. Außerdem besitzen die Pflanzenzellen eine Zellmembran, die bei menschlichen Zellen nur ganz selten vorkommt, bei den Samenzellen jedenfalls aber nicht vorhanden ist.

Zusammenfassend kann also gesagt werden, daß mit Hilfe der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung nach Fluorochromierung mit Akridinorange über den Lebenszustand der Spermien kein Urteil abgegeben werden kann. Diese Methode ist also für die praktische Spermienuntersuchung in keiner Weise verwertbar. Es bleibt dahingestellt, ob nicht doch durch die Wahl eines anderen, geeigneten Fluorochroms der eingeschlagene Weg zu einem praktisch verwertbaren Ergebnis führt. Das verschiedene Verhalten der Spermien bei den verschiedenen Konzentrationen mag wohl zum Teil mit dem Lebenszustand gewisse Beziehungen haben, eine wesentlichere Rolle dabei aber spielen eine Reihe anderer Faktoren, wie Farbstoffkonzentration, Luftzutritt (das Verhalten am Rande des Präparates ist manchmal anders als in der Mitte), Sauerstoffkonzentration usw., und zwar unter sehr subtilen Bedingungen.

Literatur

- Höber R.*, Physikalische Chemie der Zellen und Gewebe. 1926.
- Höfler K.*, Fluorochromierungsstudien an Pflanzenzellen. Beiträge zur Fluoreszenzmikroskopie. I. Sonderbd. Z. Mikroskopie **1** (1949): 46—70.
- Marcus H.*, Über die Struktur des menschlichen Spermiums. Arch. Zellforsch. **15** (1921), 4.
- Patzelt V.*, Histologie, Lehrbuch für Mediziner. 1945.
- Stiewe H.*, Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen. Möllendorf **VII/II**, 1930.
- Strugger S.*, Der gegenwärtige Stand der Forschung auf dem Gebiet der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Bakterien. Mikroskopie **3** (1948), 1/2: 23.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Mikroskopie - Zentralblatt für Mikroskopische Forschung und Methodik](#)

Jahr/Year: 1949

Band/Volume: [4](#)

Autor(en)/Author(s): Stockinger Leopold

Artikel/Article: [Über die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung menschlicher Spermien nach Fluorochromierung mit Akridinorange. 53-55](#)