

Sonderdruck aus

Sexualhormone und Blutgerinnung

XIV. Hamburger Symposion über Blutgerinnung
21. und 22. Mai 1971

Herausgegeben von

Prof. Dr. R. MARX

I. Medizinische Universitätsklinik München

und

Prof. Dr. H. A. THIES

Chirurgische Klinik der Städtischen Krankenanstalten von Heilbronn

Mit 105 Abbildungen und 70 Tabellen

19



71

F. K. SCHATTAUER VERLAG · STUTTGART-NEW YORK

Ansatzpunkte für eine antienzymatische Kontrazeption

H. FRITZ, E. FINK und R. MARX

Grundlegende Begriffe

Die in den Testes gebildeten Spermien werden in der Epididymis gespeichert (*epididymale* Spermien). Bei der Ejakulation erfolgt der Kontakt zwischen epididymalen Spermien und u. a. dem Sekret der Vesikulardrüsen (*ejakulierte* Spermien). Nach Ablagerung des Spermas in der Vagina, bei manchen Säugern auch direkt im Uterus, wandern die ejakulierten Spermien durch Zervix und Uterus bis zur Ampulle des Eileiters. Während dieser Wanderung, die etwa 4 bis 8 Std. dauert, erlangen die Spermien erst die Befruchtungsfähigkeit, sie werden *kapazitiert* (1a–1d). Die Geschwindigkeit dieses physiologischen Reifungsprozesses hängt ab vom endokrinen Funktionszustand des weiblichen Genitaltraktes: Unter Progesteroneinfluß wird die Kapazitierung der Spermien nahezu völlig unterbunden, während unter dem Einfluß von Östrogenen die für die Kapazitierung notwendige Zeitspanne stark verkürzt ist (1a, 1c). Eine morphologische Veränderung der Spermien durch den Kapazitierungsvorgang ist nicht erkennbar (1a, 1d).

Epididymale und ejakulierte Spermien, die nicht für einige Zeit im weiblichen Genitaltrakt (Uterus oder Eileiter) verweilen, sind nicht befruchtungsfähig. Eine In-vitro-Kapazitierung von Spermien in Follikular- und Tubarflüssigkeit erscheint möglich (1g).

Bringt man *kapazitierte* Spermien in Kontakt mit Seminalplasma, so verlieren sie ihre Befruchtungsfähigkeit, sie werden dekapazitiert (1f, 2). Über die Dekapazitierung von Spermien bei In-vitro-Versuchen in Gegenwart kontrazeptiver Steroide wurde berichtet (3).

Zur Morphologie und Biochemie von Spermium und Ovum

Am Kopf des Spermiums befindet sich die sog. Akrosomenkappe, die eine lysosomale Enzymausstattung enthält (4). Im Akrosom sind u. a. folgende Enzyme lokalisiert: Hyaluronidase (4, 5), eine Spermien-Neuraminidase (6), ein Corona penetrating enzyme (CPE) (7a, b) sowie eine Protease mit trypsin-ähnlicher Spezifität, das Akrosin oder Trypsin like enzyme (TLE) (5, 8, 9). Vgl. dazu die schematische Darstellung in Abb. 1.

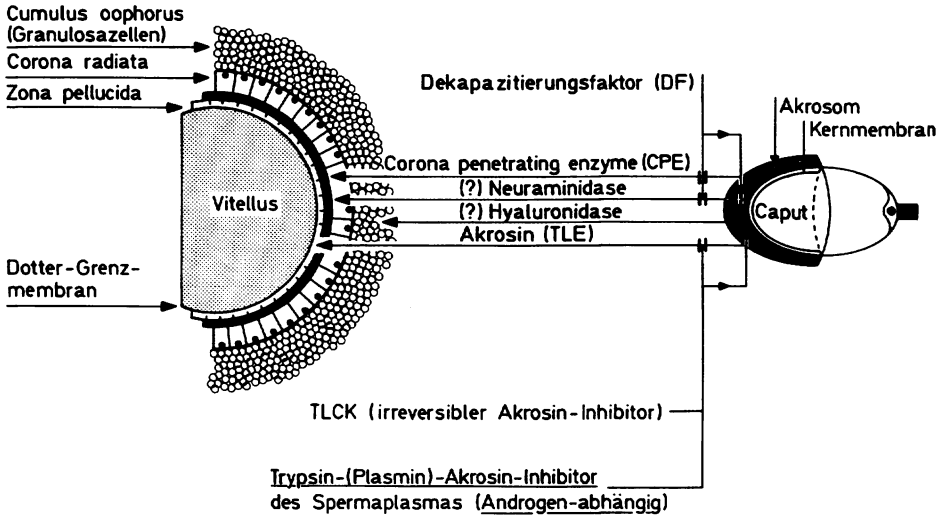


Abb. 1. Schematische Darstellung von Ovum und Spermium mit den Penetrationsenzymen des Akrosoms sowie deren Inhibitoren.



Abb. 2a

Abb. 2. Zur Morphologie der Akrosomenreaktion [Aufnahme von J. M. BEDFORD (1a)].
 a) Kopfteil eines kapazitierten (?) Spermiums – Akrosomenkappe links und subakrosomales Material (Verdickung im Mittelteil) sind deutlich erkennbar. b) Akrosomenreaktion – die Akrosomenkappe löst sich in kleine Bläschen auf, das subakrosomale Material wird nicht abgestoßen. Z: Zona pellucida, C: Corona radiata-Zelle, V: gebildete Bläschen.
 c) Das Spermium durchdringt (mit dem Kopfteil voraus von re. nach li.) die Zona pellucida – das Akrosom ist völlig abgestoßen, das subakrosomale Material ist noch vorhanden.



Abb. 2b



Abb. 2c

Diese Enzyme sind hauptsächlich verantwortlich dafür (s. u.), daß das Spermium die das Ei umgebenden Zellschichten und Membranen zu durchdringen vermag.

Das Ei ist außen mit einer dicken Schicht von Granulosazellen (Cumulus oophorus) umgeben. Diese Zellschicht unterliegt insofern einer Veränderung, als sie auch für kapazitierte Spermien erst einige Zeit (bei Mäusen z. B. nach etwa 2 Std.) nach der Ovulation durchdringbar wird (1a). Eine wesentlich dünnere Schicht von Corona-radiata-Zellen schließt sich an; die Corona-radiata-Zellen sitzen direkt auf der Membran der Zona pellucida auf (Abb. 1). Die innerste Begrenzung stellt die Vitellus-Membran dar.

Zu Beginn des Befruchtungsvorganges kommt es an der Oberfläche der Zona pellucida zur sog. Akrosomenreaktion (Abb. 2): Nach erfolgtem Kontakt des Spermiums mit der Membranoberfläche löst sich seine Akrosomenmembran in lauter kleine Bläschen auf, so daß die im Akrosom enthaltenen Enzyme freigegeben werden (1a, 1d). Das Spermium durchdringt nun ohne seine Akrosomenkappe die Zona pellucida (1a, 1d); evtl. sind bei diesem Prozeß an subakrosomale Membranen gebundene Enzyme beteiligt. Dieses morphologisch feststellbare subakrosomale Material wird vom Spermium nicht abgestoßen (1a). Nur kapazitierte Spermien sind zu dieser »echten« Akrosomenreaktion befähigt; epididymale, frisch ejakulierte und dekapazitierte Spermien stoßen ihr Akrosom beim Kontakt mit der Zona pellucida nicht ab (1a, 1d).

Corona penetrating enzyme (CPE) und Dekapazitierungsfaktor (DF)

Die Einwirkung akrosomaler Extrakte aus ejakulierten Spermien von Kaninchen und Mensch (7a) und von angereicherter CPE-Substanz (7b) auf das befruchtbare Kaninchenei führt zur vollständigen Dispersion der Corona-radiata-Zellen. Wahrscheinlich werden durch CPE nur interzelluläre Bindungen gelöst, da die Corona-radiata-Zellen nach der Dispersion noch unverändert lebensfähig sind (7a). Die Zona pellucida wird durch diese Extrakte (das Akrosin liegt hier als Akrosin-Inhibitor-Komplex vor, s. u.) nicht angegriffen.

Nach vorheriger Inkubation dieser akrosomalen Extrakte mit Seminalplasma oder mit stark angereicherter (1f, 10) DF-Substanz besitzen diese nur noch eine sehr geringe Dispersionswirkung auf die Corona radiata-Zellen (7a). DF kommt im Seminalplasma von Bullen in einer höhermolekularen sedimentierbaren Form vor, aus der durch Pronaseeinwirkung ein noch aktives Polypeptid mit einem Molekulargewicht von etwa 500 abgespalten werden konnte (10), das seinerseits wiederum durch Proteasen hydrolysierbar und somit inaktivier-

bar ist (11). Die DF-Aktivität des Bullenspermas ist durch Ultrazentrifugation nur zum Teil sedimentierbar, die des Kaninchenspermas dagegen vollständig (10). In der bei 100 000 g sedimentierbaren Form ist die DF-Substanz evtl. an ein hochmolekulares Trägerprotein gebunden. [Für ausführlichere Angaben über DF s. Übersichtsreferat (1f)].

DF hemmt somit das Corona penetrating enzyme sowie wahrscheinlich auch die Spermien-Neuraminidase (6); Trypsin und Hyaluronidase werden durch ihn *nicht* gehemmt (7a). Andererseits hemmt der Trypsininhibitor aus Sojabohnen zwar die Auflösung der Zona pellucida durch Akrosin (s. u.), nicht jedoch die Dispersionswirkung von CPE (7a).

Die geschilderten Ergebnisse der In-vitro-Versuche wurden durch In-vivo-Untersuchungen bestätigt: Kapazitierte Spermien sind nach Inkubation mit der DF-Substanz oder mit Seminalplasma dekapazitiert (1f, 2, 12). – Die Enzymnatur von CPE bedarf noch einer Bestätigung; es wäre auch vorstellbar, daß z. B. eine durch einen »Oberflächenfaktor« bewirkte Landungsänderung an Membranen zur Dispersion der Corona radiata-Zellschicht führt (7a, 13).

Akrosin (Trypsin like enzyme: TLE)

Das Vorkommen eines Enzyms mit trypsinähnlicher Spezifität in Spermien wurde bereits 1935 von YAMANA (14) und später von BURUIANA (15) beschrieben; eine etwas eingehendere Charakterisierung gelang WALDSCHMIDT, HOFFMANN und KARG (16). Die Lokalisation von TLE im Akrosom haben STAMBAUGH und BUCKLEY 1969 überzeugend demonstriert (5). Von ZANEVELD u. Mitarb. (9) wurde TLE aus Kaninchenspermien in weitgehend reiner Form isoliert und dafür der Name Akrosin vorgeschlagen. Die Ähnlichkeit des Akrosins mit Trypsin geht aus der vergleichenden Gegenüberstellung einiger ausgewählter Eigenschaften verschiedener Serinproteasen deutlich hervor (Tab. 1).

Hohe Akrosinaktivitäten fanden ZANEVELD u. Mitarb. (8, 9, 17) nur in akrosomalen Extrakten epididymaler und kapazitierter Spermien, während die Extrakte frisch ejakulierter Spermien keine oder nur eine sehr geringe BAEE-spaltende Aktivität aufwiesen (Tab. 2). Wurden letztere jedoch an DEAE-Zellulose chromatographiert, so war wiederum eine relativ hohe Akrosinaktivität nachweisbar (Tab. 2). Offensichtlich wird bei diesem Reinigungsschritt ein Hemmstoff vom Akrosin abgetrennt. Die Ergebnisse weiterer Untersuchungen [vgl. Abb. 1 in (9)] rechtfertigen die Annahme, daß das Akrosin in den akrosomalen Extrakten ejakulierter Spermien reversibel an einen Hemmstoff gebunden, als Akrosin-Inhibitor-Komplex, vorliegt.

Tab.1. Eigenschaften von Akrosin und trypsinähnlichen Proteinasen nach ZANEVELD u. Mitarb. (9).

	Akrosin ¹⁾	Trypsin	Plasmin ²⁾	Thrombin	Plasma-Kallikrein ²⁾	Organ-Kallikrein ³⁾
MG × 10 ⁻³	55	23,8	82,9	33	97	34
Autoproteolyse	+	+	+	—	—	—
pH 2–3 stabil	+	+	+	—	—	—
pH Optimum bei	8	8	8	8	8,5	8,5
Spaltung von						
BAEE ⁴⁾	++	+	++	++	++	++
TAME ⁵⁾	+	++	++	++	+	+
Hemmung durch						
TLCK ⁶⁾	+	+	+	+		—
DFP ⁷⁾	+	+	+	+	+	+
α ₁ -Antitrypsin	+ ⁸⁾	+	+	—	+ ⁸⁾	+ ⁸⁾
Sojabohnen-I (SBI) ⁹⁾	+	+	+	—	+	—
Kunitz-I (BPTI) ¹⁰⁾	+	+	+	—	+	+
Meersch. TI ¹¹⁾	+	+	—	—	—	—
Meersch. TPI ¹²⁾	+	+	+	—	—	—

1) Aus Kaninchenspermien

2) Aus Schweineserum

3) Aus Schweinepankreas

4) N-Benzoyl-L-argininäthylester

5) N-Tosyl-L-arginin-äthylester

6) siehe Abb. 6

7) Diisopropyl-fluorphosphat

8) Progressivhemmung, s. Text

9) Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor (Kunitz)

10) Basischer Pankreas-Trypsin-Inhibitor, identisch mit Trasylol

11) Trypsininhibitor aus Meerschweinchen-Samenblasen, s. Text

12) Trypsin-Plasmin-Inhibitor aus Meerschweinchen-Samenblasen, s. Text

Tab.2. Akrosinaktivität verschiedener akrosomaler Extrakte nach ZANEVELD, SRIVASTAVA und WILLIAMS (8, 9).

Extrakt aus Spermien	mU (BAEE) per mg Protein
epididymalen	84–430
kapazitierten	80–130
frisch ejakulierten	0–10
ejakulierten, nach Chromatographie an DEAE-Cellulose	40–150

Akrosininhibitoren

Die Akrosininhibitoren wurden als Trypsininhibitoren 1965 von HAENDLE u. Mitarb. (18, 19) und unabhängig davon 1966 von WALDSCHMIDT u. Mitarb. (16) entdeckt: Sie kommen vor in den Vesikulardrüsen und im Sperma der Säugetiere (18, 20) und in geringerer Konzentration auch in epididymalen Sekreten (6, 17, 21). In Tab.3 ist die Inhibitoraktivität bei verschiedenen Spezies angegeben; besonders hoch ist sie in den Samenblasen von Meer-schweinchen und Bulle. Als Produktionsstätte der Inhibitoren kommen haupt-sächlich die Vesikulardrüsen in Frage (18, 20).

Tab. 3. Mittlere Trypsininhibitor-Konzentrationen in verschiedenen Organen und Sekreten. 1 mIU entspricht der Hemmung von ca. 1 μ g Trypsin.

	mIU/g bzw. ml
Gl. submand. vom Hund (Gewebe)	10000
Samenblasen von Meerschweinchen	4200
Sperma von Bullen	3000
Menschliches Serum	1100
Menschliches Sperma	200
Säugetierpankreas ¹⁾	150
Urin	< 8

¹⁾ Die Inhibitorkonzentration ist stark abhängig vom Funktionszustand der Drüse (24).

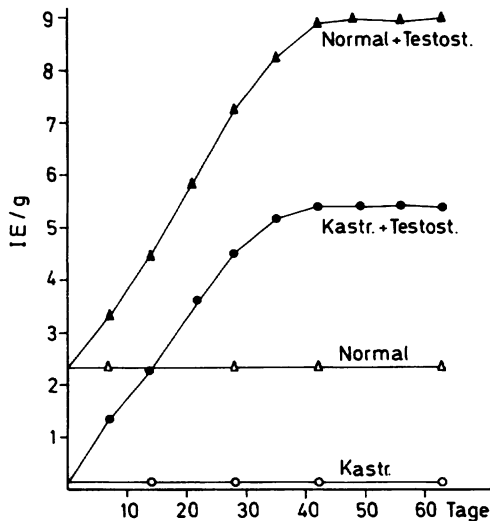


Abb. 3. Inhibitorkonzentration in der Gl. vesicularis der Maus nach H. HAENDLE u. Mit-
arb. (18) – normal, 30 Tage nach Kastration, sowie nach Stimulierung mit Testosteron
(als Propionat, zweimal wöchentlich je 0,25 mg). 1 IE hemmt ca. 1 mg Trypsin.

Aus den Samenblasen von Meerschweinchen konnten wir (22, 23) mehrere unterschiedliche Formen sowohl eines Trypsininhibitors als auch eines Trypsin-Plasmin-Inhibitors isolieren. Ob beide Inhibitoren in das Vesikularsekret abgegeben werden oder einer – ähnlich wie beim Rinderpankreas (24) – gewebständig ist, ist noch zu klären. Aus Schweinesperma konnten wir nur einen Trypsin-Plasmin-Inhibitor gewinnen (23). Blutegel enthalten ebenfalls Trypsin-Plasmin-Inhibitoren (25), nach einem Vorschlag von R. MARX Bdelline genannt, und zwar in besonders hoher Konzentration im Bereich der Sexualorgane (26). Aminosäurezusammensetzungen und Molekulargewichte dieser Inhibitoren, sowie zum Vergleich des Trypsin-Kallikrein-Inhibitors (Firmenname: Trasylol) aus Rinderorganen, sind in Tab.4 angegeben. Alle diese Inhibitoren dürften, soweit nicht bereits erwiesen (Tab.1), auch Akrosin

Tab.4. Aminosäurezusammensetzungen und Molekulargewichte einiger Proteinaseinhibitoren (u. a. aus Samenblasen und Spermplasma, s. Text). TI: Trypsininhibitor, TPI: Trypsin-Plasmin-Inhibitor.

	Meerschweinchen-Samenblasen ¹⁾		Eber-Spermaplasma ²⁾	Bdelline aus Blutegeln ³⁾		Kunitz-Inhibitor (Trasylol)
	TI	TPI	TPI	TPI		BPTI
				B ₃	A ₄	
Asp	6	6	11	5	8	5
Thr	1	4	6	4	3	3
Ser	2	5	7	2	3	1
Glu	10	4	8	6	5	3
Pro	5	2	4	–	3	4
Gly	6	5	8	4	4	6
Ala	1	–	4	4	4	6
Cys ¹ / ₂	6	6	8	6	10	6
Val	3	3	2	4	5	1
Met	–	1	2	–	1	1
Ile	4	1	4	–	1	2
Leu	5	3	4	2	1	2
Tyr	2	4	4	1	1	4
Phe	–	3	7	–	2	4
Lys	1	4	8	1	5	4
His	2	3	4	5	3	–
Arg	6	4	8	1	–	6
Trp	–	–	2	–	–	–
Glukosamin	–	–	3	–	–	–
Galaktosamin	–	–	2	–	–	–
Summe	60	58	104	45	59	58
Mol. Gew.	6772	6687	11607	4830	6339	6511

¹⁾ Aus (22, 23)

²⁾ Aus (23)

³⁾ Aus (25)

inhibieren. Trypsin und Plasmin sowie sicherlich auch Akrosin hemmen sie reversibel, d. h. die betreffenden inaktiven Enzym-Inhibitor-Komplexe dissoziieren unter geeigneten Bedingungen (z. B. bei Erniedrigung des pH-Wertes der Lösungen oder in Gegenwart hoher Substratkonzentrationen) wieder in ihre aktiven Einzelkomponenten.

Die Synthese der Inhibitoren ist hormongesteuert (18, 20), sie wird z. B. bei Mäusen durch Testosterongaben stark stimuliert (Abb. 3). Etwas 30 Tage nach der Kastration erreicht die Inhibitorkonzentration in den Samenblasen minimale Werte, um unter Testosteroneinfluß auf ein Vielfaches des Ausgangswertes anzusteigen (Abb. 3). Die Bestimmung der Inhibitorkonzentration in Samenblasen und Spermaplasma zur Testung androgener Wirkstoffe liegt deshalb auf der Hand.

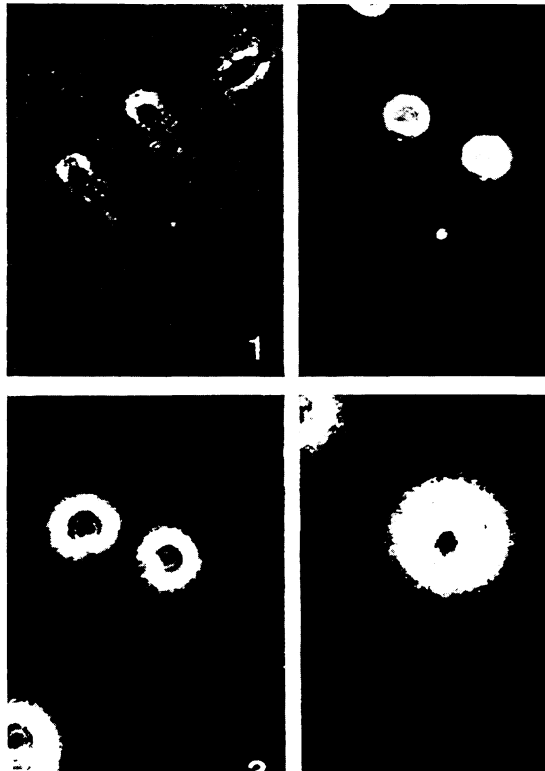


Abb. 4. Lysiswirkung epididymaler Kaninchenspermien auf eine Gelatinmembran nach GADDUM und BLANDAU (31) – Lysishöfe sind bereits wenige min nach dem Aufbringen der Spermien, ausgehend von deren Akrosomenregion, sichtbar (Bild 1), bei fortschreitender Inkubation vergrößern sie sich rasch (Bild 2, 3, 4). Werden die Spermien vor dem Aufbringen in einer Inhibitorlösung (Trypsininhibitor aus Sojabohnen) inkubiert, so ist die Lysiswirkung drastisch vermindert.

Neben diesen Inhibitoren kommt im Spermaplasma, ähnlich wie im Zervixsekret (1h, 27), auch das α_1 -Antitrypsin des Serums in nicht unerheblicher Konzentration vor (28). Im menschlichen Sperma sind so z. B. immerhin etwa 20% der gesamten Trypsinhemmkapazität auf die Gegenwart des α_1 -Antitrypsins zurückzuführen. α_1 -Antitrypsin hemmt Akrosin ebenfalls (Tab. 1), und zwar nach neuesten Befunden von G. F. B. SCHUMACHER (29) progressiv, d. h. nach einem ähnlichen Hemmechanismus wie das Kallikrein aus Schweinepankreas (30).

Es ist nicht abwegig, den Proteaseinhibitoren in Spermaplasma, Zervixsekret sowie weiteren Sekreten genitalen Ursprungs eine *Schutzfunktion* zuzuschreiben. Eine sehr große Zahl von Spermien verliert während ihres In-vivo-Daseins im männlichen und weiblichen Genitaltrakt ihre Akrosomenkappe, J. M. BEDFORD (1a, 1d) nennt dies die »zufällige« Akrosomenreaktion. Dabei wird ein beträchtliches proteolytisches Potential freigesetzt, das durch die Inhibitoren rasch und wirksam blockiert wird, wodurch u. U. eine Schädigung von Schleimhautzellen, intakten Spermien u. a. vermieden wird. GADDUM und BLANDAU (31) gelang es, die Lysiswirkung des Akrosomeninhalts einzelner Spermien auf Gelatineschichten augenfällig zu demonstrieren (Abb. 4); nach vorheriger Inkubation der Spermien mit Inhibitoren war diese Wirkung nahezu aufgehoben (Abb. 4).

Zur Biochemie des Kapazitierungs- und Dekapazitierungsvorgangs

Bei der Ejakulation, d. h. nach dem Kontakt zwischen Spermien und dem Sekret der Vesikulardrüsen, diffundieren der (die) Inhibitor(en) und evtl. auch die DF-Substanz durch die äußere Akrosomenmembran in das Akrosom. Die Triebfeder dieser Diffusion könnte die sehr geringe Konzentration an freiem Inhibitor innerhalb des Akrosoms sein, da dieser durch die sehr rasche Bildung des Akrosin-Inhibitor-Komplexes laufend »verbraucht« wird (Abb. 5). Für diese Annahme sprechen auch die Ergebnisse der In-vitro-Versuche von ZANEVELD

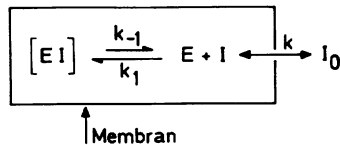


Abb. 5. Schematische Darstellung der Bildung und Dissoziation des Akrosin-Inhibitor-Komplexes – Durch die »Entfernung« eines Partners (z. B. des Inhibitors) wird das Gleichgewicht entsprechend verschoben (s. Text). [EI]: Enzym-Inhibitor-Komplex (Konz.); E: Enzymkonz.; I: Inhibitorkonz. innerhalb des Akrosoms; I_0 : Inhibitorkonz. außerhalb des Akrosoms; k_1 u. k_{-1} : Assoziations- bzw. Dissoziationskonstante; k : Diffusionskonstante.

u. Mitarb. (6, 9): Während die Akrosinaktivität akrosomaler Extrakte epididymaler Spermien bei 151 mU (BAEE-Spaltung) lag, war diese nach vorheriger Inkubation von epididymalen Spermien mit Seminalplasma auf 8 mU abgesunken. Der *Dekapazitierung* würde somit die Blockierung der Akrosinaktivität

Tab. 5. Beeinflussung der Befruchtung in vivo durch Trypsininhibitoren von Säugern nach ZANEVELD u. Mitarb. (9, 35). BPTI: Basischer Pankreas-Trypsin-Inhibitor (Kunitz) = Trasylol; STI: Seminalplasma-Trypsin-Inhibitor von Kaninchen; Kontrolle: derselbe Versuch ohne Inhibitorzusatz durchgeführt.

Zugefügt pro 10 ⁵ Spermien	Zahl der Kaninchen	Befruchtete Eier pro Gesamtzahl der Eier	Befruchtet (%)
BPTI (200 µg) ¹⁾	10	8/49	16,3
Kontrolle	10	28/37	75,7
BPTI (200 µg) ²⁾	7	2/22	9,1
Kontrolle	7	15/22	68,2
STI (250 µg)	5	1/14	7,1
Kontrolle	5	17/18	94,4

¹⁾ Inkubationsgemisch (Spermien plus Inhibitor) in die Eileiter eingeführt

²⁾ Spermien erst nach Abtrennung der Inhibitorlösung durch Zentrifugation zur Insemination verwendet

im Akrosom durch die Komplexbildung mit dem Inhibitor und evtl. auch die Hemmung der CPE-Aktivität durch eine analoge Inhibierung durch DF zugrundeliegen.

Der *Kapazitierung* würde der umgekehrte Vorgang entsprechen: Inhibitor und DF diffundieren während der Wanderung der Spermien im weiblichen Genitaltrakt wieder durch die Akrosomenmembran in das umgebende Milieu, in dem die Konzentration beider Stoffe äußerst gering (Triebfeder!) ist, da die Spermien ja durch die aktive Fortbewegung laufend auf »neue«, noch nicht die beiden Stoffe enthaltende Sekrete treffen.

Die Beteiligung weiterer, wahrscheinlich hitzelabiler und somit höhermolekularer Faktoren bei der Diffusion von Inhibitor bzw. DF durch die Akrosomenmembran ist sehr wahrscheinlich (6). Dafür sprechen auch die Ergebnisse von In-vitro-Versuchen: Die Kapazitierung scheint demnach nur in Gegenwart von Sekreten weiblicher Genitalorgane (Uterus, Eileiter, Follikel) zu gelingen (1 a, b, d, g; 32).

Akrosin und Zona pellucida

Die Durchdringung der Zona pellucida des Eies durch das kapazitierte Spermium dürfte im wesentlichen mit Hilfe des Akrosins erfolgen. Diese Annahme wird durch folgende Befunde gestützt:

1. Das dem Akrosin in seiner Wirkungsspezifität sehr ähnliche Trypsin vermag die Zona pellucida aufzulösen (39).
2. Die Trypsininhibitoren aus Sojabohnen und Limabohnen (5) und die Trypsin- bzw. Trypsin-Plasmin-Inhibitoren aus Meerschweinchen-Samenblasen (33) sind imstande, die durch akrosomale Spermienextrakte verursachte Auflösung der Zona pellucida völlig zu verhindern.
3. Werden kapazitierte Spermien vor der Insemination in Gegenwart von Trypsin-Inhibitoren inkubiert (20 min bei 37° C), so ist ihre Befruchtungsfähigkeit im Vergleich zu solchen kapazitierten Spermien, die im nicht inhibitorhaltigen Kontrollmedium inkubiert wurden, signifikant vermindert (9, 34, 35) (Tab. 5). Der Inhibitor muß dabei während der Inkubation in das Akrosom diffundiert sein, da die Befruchtungsfähigkeit nach der Inkubation gewaschener (BPTI¹) in Tab. 5) und nicht gewaschener Spermien (BPTI²) etwa gleich stark vermindert ist. Auffallend ist die starke Verminderung der Befruchtungsrate durch den Trypsin-Plasmin-Inhibitor (TPI) aus Meerschweinchen-Samenblasen; der Trypsininhibitor (TI) ist bei diesen In-vivo-Versuchen wesentlich schwächer wirksam (9) (Tab. 6).

Die entscheidende Rolle des Akrosins und die Bedeutung der Akrosininhibitoren für den Befruchtungsvorgang geht aus den Ergebnissen dieser Untersuchungen klar hervor.

Tab. 6. Beeinflussung der Befruchtungsfähigkeit von *kapazitierten* Kaninchenspermien durch die Inhibitoren aus Meerschweinchensamenblasen (22, 23) nach ZANEVELD u. Mitarb. (9). TPI: Trypsin-Plasmin-Inhibitor. TI: Trypsininhibitor. Kontrolle: Insemination des Kontrollansatzes (ohne Inhibitor) jeweils im kontralateralen Eileiter.

Zugefügt pro 10 ⁵ Spermien	Zahl der Kaninchen	Anzahl der Eier	Befruchtet (%)
TPI (100 µg, 170 mIU)	4	14	14,3
Kontrolle		10	100
TI (250 µg, 750 mIU)	5	15	73,5
Kontrolle		10	90

Befruchtungshemmung durch irreversible Akrosininhibitoren

Während die natürlichen Inhibitoren Trypsin wie auch Akrosin nur reversibel hemmen, blockieren geeignete synthetische Inhibitoren, wie z. B. N^α-Tosyl-L-lysyl-chlormethyl-ke-ton (TLCK) (Formel s. Abb. 6) Trypsin im reaktiven Zentrum irreversibel. Die Entdeckung von ZANEVELD u. Mitarb. (9, 36), daß TLCK auch das aktive Zentrum des Akrosins blockiert, eröffnet zumindest von der Theorie her die Möglichkeit einer permanenten Hemmung der Befruch-

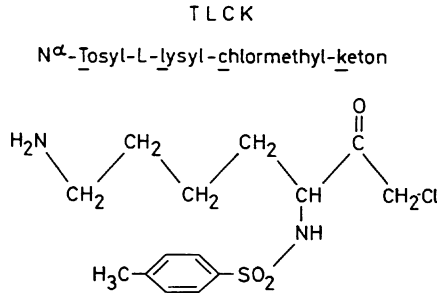


Abb. 6. TLCK – Akrosin irreversibel bindender synthetischer Inhibitor.

tung während des In-vivo-Daseins der Spermien. ZANEVELD u. Mitarb. (9, 36) konnten bei ihren In-vitro- und In-vivo-Versuchen eindeutig nachweisen, daß die Einwirkung relativ geringer Dosen von TLCK auf kapazitierte (Tab. 7) und ejakulierte (Tab. 8) Spermien zu einer sehr starken Herabsetzung bis zu einer völligen Verhinderung ihrer Befruchtungsfähigkeit führt. TLCK ist demnach auch imstande, den im Akrosom ejakulierter Spermien an das Akrosin gebun-

Tab. 7. Einfluß von TLCK auf die Befruchtungsfähigkeit *kapazitierter* Kaninchenspermien nach ZANEVELD u. Mitarb. (9, 36). TLCK: Akrosin irreversibel hemmender Inhibitor, s. Abb. 6. TPCK: Chymotrypsin-Inhibitor, hemmt Akrosin und Trypsin nicht. Kontrolle: wie in Tab. 6, Bedingungen s. (9, 36).

Inhibitor	Behandelte Spermien			Kontrolle	
	µg Inhibitor pro 10 ⁵ Spermien	Anzahl der Eier	Befruchtet (%)	Anzahl der Eier	Befruchtet (%)
TLCK	5	13	15,6	10	100
TLCK	15	16	0	16	87,5
TPCK	15	7	86	6	100

Tab. 8. Einfluß von TLCK auf die Befruchtungsfähigkeit *ejakulierter* Kaninchenspermien nach ZANEVELD u. Mitarb. (9, 36). TLCK: s. Tab. 7 und Abb. 6. Kontrolle: wie in Tab. 6, Bedingungen s. (9, 36).

µg TLCK pro 10 ⁵ Spermien	Behandelte Spermien		Kontrolle	
	Anzahl der Eier	Befruchtet (%)	Anzahl der Eier	Befruchtet (%)
3	20	9	14	100
10	25	0	19	100

denen »natürlichen« Inhibitor zu verdrängen und anschließend Akrosin *irreversibel* zu blockieren. Die direkte Einführung von TLCK in die Vagina (Tab. 9) und die Verwendung von TLCK in Vaginalcremen (Tab. 10) bei Züchtungsversuchen zeitigte denselben befruchtungshemmenden Erfolg (9, 36).

Tab. 9. Antifertilitätseffekt von TLCK bei vaginaler Applikation bei Züchtungsversuchen nach ZANEVELD u. Mitarb. (9, 36).

TLCK mg/ml	Kaninchen, Anzahl	Anzahl der Eier	Befruchtet (%)
0	5	37	100
1	5	34	38,3
2	4	32	6,2
3	5	28	0

Tab. 10. Kontrazeptive Aktivität von Delfen-Vaginal-Creme vermischt mit TLCK nach ZANEVELD u. Mitarb. (9).

TLCK mg/ml	Kaninchen Anzahl	Anzahl der Eier	Befruchtet (%)	Bereich
0	7	40	52,5	0-100
3	5	48	14,6	0-33
5	4	28	10,7	0-25

Ausblick

Die Inhibierung des Akrosins durch Inhibitoren und somit die Blockierung der Befruchtungsfähigkeit von Spermien ist grundsätzlich sowohl im männlichen als auch im weiblichen Genitaltrakt möglich. Die Verwendung irreversibler Inhibitoren wäre aufgrund ihrer Dauerwirkung vorzuziehen. Obwohl von der Theorie her eine antienzymatische Kontrazeption somit grundsätzlich möglich erscheint, sind aus praktischer Sicht noch wesentliche Probleme zu lösen. Dazu gehört neben der günstigsten Anwendungsform die Erreichung einer genügend hohen lokalen InhibitorKonzentration. Bei den irreversiblen Inhibitoren ist ihre evtl. Toxizität zu berücksichtigen.

Erste umfassende Versuche in dieser Richtung, durch Injektion und Infusion hoher Trasyol-Dosen im Tierversuch eine Verminderung der Befruchtungsrate zu erzielen, waren erfolglos (37). Die stetige Eliminierung dieses Inhibitors aus dem Organismus durch die Nieren (38) verhindert die Erreichung der benötigten InhibitorKonzentration in den Genitalorganen bzw. deren Sekreten. Vaginale Kontrazeptiva auf Inhibitorbasis könnten in naher Zukunft jedoch Bedeutung erlangen.

Literatur

- (1) Neuere Übersichtsliteratur:
- (1a) Bedford, J. M.: In H. Gibian, E. J. Plotz: *Mammalian Reproduction*. 21. Colloquium der Gesellschaft für Biologische Chemie, Mosbach 1970. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1970, S. 124–182.
- (1b) Austin, C. R.: In: G. Raspé: *Advances in Biosciences 4*. Schering Symposium on Mechanisms Involved in Conception, Berlin 1969. Pergamon-Press Vieweg-Verlag, Braunschweig 1970, S. 5–11.
- (1c) Chang, M. C. ebenda, S. 13–24.
- (1d) Bedford, J. M., ebenda, S. 35–50.
- (1e) Ericsson, R. J., ebenda, S. 51–59.
- (1f) Williams, W. L., R. T. Robertson, W. R. Dukelow, ebenda, S. 61–72.
- (1g) Brackett, B. G., ebenda, S. 73–94.
- (1h) Schumacher, G. F. B. ebenda, S. 95–119.
- (2) Chang, M. C.: A Detrimental Effect of Seminal Plasma on the Fertilizing Capacity of Sperm. *Nature (Lond.) 179: 258 (1957)*.
- (3) Gwatkin, R. B. L., D. T. Williams: Inhibition of Sperm Capacitation in vitro by Contraceptive Steroids. *Nature (Lond.) 227: 182 (1970)*.
- (4) Dott, H. M., J. T. Dingle, H. B. Fell: *Lysosomes in Biology and Pathology*. North-Holland Publishing Company. Amsterdam, London 1969, S. 230–260; A. Allison: Lysosomes and Disease: *Scientific American 217*, Nr. 5, Nov. 1967, S. 62–72.
- (5) Stambaugh, R., J. Buckley: Identification and subcellular Localisation of the Enzymes Effecting Penetration of the Zona Pellucida by Rabbit spermatozoa. *J. Reprod. Fert 19: 423 (1969)*; dieselben, Zona Pellucida Dissolution Enzymes of the Rabbit Sperm Head. *Science 161: 585 (1968)*.
- (6) Zaneveld, L. J. D., P. N. Srivastava, W. L. Williams: Inhibition by Seminal Plasma of Aerosomal Enzymes in intact Sperm; *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 133: 1172 (1970)*.
- (7a) Zaneveld, L. J. D., W. L. Williams: A Sperm Enzyme that Disperses the Corona Radiata and its Inhibition by Decapacitation Factor. *Biol. Reprod. 2: 363 (1970)*.
- (7b) Zaneveld, L. J. D., R. A. McRorie, W. L. Williams: *Fed. Proc. Amer. Soc. exp. Biol. 28: 705 (1969)*.
- (8) Zaneveld, L. J. D., P. N. Srivastava, W. L. Williams: Relationship of a trypsin-like enzyme in rabbit spermatozoa to capacitation. *J. Reprod. Fert. 20: 337 (1969)*.
- (9) Zaneveld, L. J. D., K. L. Polakoski, R. T. Robertson, W. L. Williams: Trypsin Inhibitors and Fertilization. In: H. Fritz, H. Tschesche: *Proceedings of the International Research Conference on Proteinase Inhibitors, Munich, 1970*. Verlag Walter de Gruyter u. Co., Berlin 1971, S. 236–244.
- (10) Pinsker, M. C., W. L. Williams: Properties of a Spermatozoan Antifertility Factor. *Arch. Biochem. 122: 111 (1967)*; siehe auch: R. T. Robertson, M. C. Pinsker, W. O. Caster, W. L. Williams: *Fed. Proc. Amer. Soc. exp. Biol. 28: 705 (1969)*.
- (11) Robertson, R. T., V. K. Bhalla, W. L. Williams: Unveröffentlicht [angegeben in (9)].
- (12) Dukelow, W. R., H. N. Chernoff, W. L. Williams: Properties of decapacitation factor and presence in various species. *J. Reprod. Fert. 14: 393 (1967)*.
- (13) Ruhenstroth-Bauer, G.: In: *Mammalian Reproduction*. (1a) S. 183–188.
- (14) Yamane, J.: Kausal-analytische Studien über die Befruchtung des Kanincheneies. I. Die Dispersion der Follikelzellen und die Ablösung der Zellen der Corona Radiata des Eies durch Spermatozoen. *Cytologia 6: 233 (1935)*. II. Die Isolierung der auf das Eizytoplasma auflösend wirkenden Substanzen aus den Spermatozoen. *Cytologia 6: 475 (1935)*.
- (15) Buruiana, L. M.: Sur l'activité-hyaluronidasique et trypsinique du sperme. *Naturwissenschaften 43: 523 (1956)*.

- (16) Waldschmidt, M., B. Hoffmann, H. Karg: Untersuchungen über die tryptische Enzymaktivität in Geschlechtssekreten von Bullen. *Zuchthygiene 1*: 15 (1966).
- (17) Zaneveld, L. J. D., K. L. Polakoski, C. W. Foley, W. L. Williams: The Role of Acrosin, an acrosomal Protease, and Acrosin Inhibitor in Capacitation of Sperm. *Fed. Proc. 30*: Nr. 2, Abstr. 2241 (1971).
- (18) Haendle, H., H. Fritz, I. Trautschold, E. Werle: Über einen hormonabhängigen Inhibitor für proteolytische Enzyme in männlichen accessorischen Geschlechtsdrüsen und im Sperma. *Z. physiol. Chem. 343*: 185 (1965).
- (19) Fritz, H., I. Trautschold, H. Haendle, E. Werle: Chemistry and Biochemistry of Proteinase Inhibitors from Mammalian Tissues. *Ann. N.Y. Acad. Sci. 146*: 400 (1968).
- (20) Werle, E., I. Trautschold, H. Haendle, H. Fritz: Physiologic, Pharmacologic, and Clinical Aspects of Proteinase Inhibitors. *Ann. N.Y. Acad. Sci. 146*: 464 (1968).
- (21) Robertson, R. T.: »Master's Thesis« Universität von Georgia, USA, 1969.
- (22) Fritz, H., E. Fink, R. Meister, G. Klein: Isolierung von Trypsininhibitoren und Trypsin-Plasmin-Inhibitoren aus den Samenblasen von Meerschweinchen. *Z. physiol. Chem. 351*: 1344 (1970); E. Fink, Dissertation, Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität München, 1970.
- (23) Fink, E., G. Klein, F. Hammer, G. Müller-Bardorff, H. Fritz: Protein Proteinase Inhibitors in Male Sex Glands, *Proc. Int. Res. Conference on Proteinase Inhibitors (9)*, S. 225-235.
- (24) Fritz, H., F. Woitinas, E. Werle: Isolierung und Charakterisierung von Proteaseinhibitoren aus den Bauchspeicheldrüsen verschiedener Wirbeltiere und des Menschen. *Z. physiol. Chem. 345*: 168 (1966).
- (25) Fritz, H., M. Gebhardt, R. Meister, E. Fink: Trypsin-Plasmin Inhibitors from Leeches, Isolation, Amino Acid Composition, Inhibitory Characteristics, *Proc. Int. Res. Conference on Proteinase Inhibitors (9)*, S. 271-280.
- (26) Marx, R.: Unpublizierte Resultate.
- (27) Schumacher, G. F. B.: Alpha₁-Antitrypsin in Uterine Secretions; *Proc. Int. Res. Conference on Proteinase Inhibitors (9)*, S. 253-255.
- (28) Schumacher, G. F. B.: Alpha₁-Antitrypsin in Seminal Fluid. *Ebenda* S. 245-246.
- (29) Schumacher, G. F. B.: Persönliche Mitteilung v. 19.3.1971 (Contraception, Aug. 1971).
- (30) Fritz, H., B. Brey, A. Schmal, E. Werle: Zur Identität des Progressin-Antikallikreins mit α_1 -Antitrypsin aus Humanserum. *Z. physiol. Chem. 350*: 1551 (1969).
- (31) Gaddum, P., R. J. Blandau: Proteolytic reaction of mammalian spermatozoa on gelatin membranes. *Science 170*: 749 (1970).
- (32) Barros, C., C. R. Austin: *J. exp. Zool. 166*: 317 (1967); R. Yanagimachi: *J. Reprod. Fert. 18*: 275 (1968); R. B. L. Gwatkin, O. F. Andersen: *Nature (Lond.) 224*: 1111 (1969).
- (33) Haendle, H., H. Ingrisich, E. Werle: Zur Bedeutung des Proteasen-Inhibitors des Säugerspermas bei der Befruchtung und zur Frage der Identität mit dem Dekapazitationsfaktor. *Klin. Wschr. 48*: 824 (1970).
- (34) Stambaugh, R., B. G. Bracket, L. Mastroiani: Inhibition of in vitro Fertilization of Rabbit Ova by Trypsin Inhibitors. *Biol. Reprod. 1*: 223 (1969).
- (35) Zaneveld, L. J. D., R. T. Robertson, M. Kessler, W. L. Williams: Inhibition of Fertilization in vivo by Pancreatic and Seminal Plasma Trypsin Inhibitors. *J. Reprod. Fert. 25*: 387 (1971).
- (36) Zaneveld, L. J. D., R. T. Robertson, W. L. Williams: Synthetic Enzyme Inhibitors as Antifertility Agents *FEBS. Letters 11*: 345 (1970).

- (37) Schumacher, G. F. B., J. R. Swartwout, F. P. Zuspan, B. Drogoje, W. Jemison: Fertility Experiments in Mice and Rabbits with the Trypsin-Kallikrein Inhibitor from Bovine Lung: Proc. Int. Res. Conference on Proteinase Inhibitors (9), S. 247-252.
- (38) Fritz, H., K.-H. Oppitz, D. Meckl, B. Kemkes, H. Haendle, H. Schult, E. Werle: Verteilung und Ausscheidung von natürlich vorkommenden und chemisch modifizierten Proteaseinhibitoren nach intravenöser Injektion bei Ratte, Hund (und Mensch). *Z. physiol. Chem.* 350: 1541 (1969).
- (39) Chang, M. C., D. M. Hunt: *Exp. Cell. Res.* 11: 497 (1956).