

## 1 Einleitung

Fruchtbarkeit (**Fertilität**) ist die wichtigste Voraussetzung dafür, dass sich Leben entwickeln und immer neu reproduzieren kann. Eine Beeinträchtigung der Fertilität gefährdet nicht nur den Erhalt einzelner Arten, sondern kann gegebenenfalls ganze Ökosysteme aus dem Gleichgewicht bringen (Kime, 1995). Außer durch akute Toxizität, bei der Schäden an Individuen direkt erkennbar sind, wirken **reproduktionstoxische Substanzen** in geringeren Konzentrationen auf subakutem und subletalem Niveau. Diese Wirkungen sind von außen ebenso schwer erkennbar wie nachweisbar und erstrecken sich über Zeiträume, die oft nicht überschaubar sind. So ist zwar schon seit über 20 Jahren bekannt, dass Substanzen wie das Insektizid Dichlordiphenyltrichlorethan (DDT) östrogene Wirkungen auf die Reproduktionsfähigkeit von Organismen haben können (Rathner & Sonneborn, 1979; McLachlan, 1980; Fry & Toone, 1981), das Ausmaß der Bedrohung durch diese sogenannten **neuartigen Wirkungen** hat aber erst in den 90er Jahren ein starkes Interesse bei Forschern, Politikern und Bürgern hervorgerufen.

Seitdem ist bei einer Reihe von weiteren Stoffen wie z.B. Tributylzinn (TBT), Bisphenol A oder Nonylphenol endokrines (hormonähnliches) Potential nachgewiesen worden. Diese Stoffe stehen nicht nur im Verdacht ganze Populationen von Fischen oder Schnecken zu „verweiblichen“ bzw. zu „vermännlichen“, sondern die endokrine Wirkung wird auch in Zusammenhang mit dem beobachteten Rückgang der Anzahl beweglicher Spermien beim Menschen gebracht. Die Gefahren, die von diesen Umwelthormonen ausgehen, wurden vom deutschen Gesetzgeber erkannt, und der Parameter Reproduktionstoxizität bzw. Fertilität wurde in umweltrelevanten Gesetzen wie dem Wasserhaushaltsgesetz (WHG) und dem Chemikaliengesetz (ChemG) berücksichtigt. Geeignete Testverfahren, um reproduktionstoxische Wirkungen im limnischen Bereich, z.B. im industriellen Abwasser, messen zu können, sind jedoch bislang nur eingeschränkt verfügbar.

Nach einer Vorstudie (Bock & Pluta, 1993) wurde vom Umweltbundesamt (UBA) im Jahr 1995 ein Forschungsprojekt mit dem Ziel gestartet, die Bedingungen für einen *in vitro* – Fertilitätstest mit **Fischspermazellen** zu untersuchen. Fischspermien als potentielle Bioindikatoren wurden ausgewählt, da sie ökologisch relevant und im Vergleich zu Keimzellen (Gameten) anderer Wasserorganismen besser verfügbar sind. Ihre Beweglichkeit (**Motilität**) ist unter Laborbedingungen mit Hilfe computergestützter Videomikrographie (CASA = computer assisted sperm analysis) sehr gut messbar. Der Parameter Motilität ist zwar nicht mit dem Parameter Fertilität gleichzusetzen, da ihm jedoch im Befruchtungsvorgang eine entscheidende Bedeutung zukommt, ist zumindest eine indirekte Beziehung abzuleiten. Demzufolge ist bei einer festgestellten Beeinträchtigung der Motilität von Fischspermien auch eine Beeinträchtigung ihres Befruchtungserfolgs zu erwarten.

Der gewählte Ansatz trägt zusätzlich in mehrerlei Hinsicht dem Tierschutzgesetz Rechnung: (1) Versuche mit Fischspermazellen sind keine Tierversuche, da es sich nicht um Organismen handelt; (2) bei fachgerechter Gewinnung des Spermias werden die Fische nicht getötet und auch nicht verletzt; (3) ein sensitiver Biotest mit Fischspermien könnte organismische Testmethoden ersetzen oder zumindest ergänzen, so dass für ökotoxikologische Prüfungen insgesamt weniger Tiere in Versuchen eingesetzt werden müssten.

### 1.1 Problemstellung

#### 1.1.1 Geeignete Fischarten

Die **Motilitätsphase** von Fischspermien ist im Gegensatz zu Säuger- und Invertebratenspermien in der Regel sehr begrenzt. Die meisten europäischen Fischarten vermehren sich durch externe Befruchtung, wobei die Gameten von Männchen und Weibchen fast zeitgleich abgelaicht werden. Beim Ablichten werden die reifen Spermien, die sich im Seminalplasma noch im Ruhezustand befinden, durch die Verdünnung im Wasser zur Bewegung angeregt. Der anschließende Zeitraum der aktiven Vorwärtsbewegung liegt zwischen 30 und 120 Sekunden (Billard 1986, Billard & Cosson, 1989). Diese kurze Zeit reicht normalerweise aus, um die abgelaichten Eier zu befruchten; als Expositions- und Messzeit in einem Biotest erscheint sie jedoch viel zu kurz, um sensitive Reaktionen hervorzurufen. Aus der Literatur ist bekannt, dass geeignete Verdünnungsmedien (Verdüner, Extender) die Motilitätsphasen um ein Mehrfaches verlängern können (Saad & Billard, 1987). Vereinzelt wird in der Literatur auch von Fischarten (z.B. Guppies, Tilapien, Pazifischer Hering) berichtet, deren Spermien natürliche Motilitätsphasen von mehr als 10 Minuten erreichen können (Billard 1978; Chao, et al., 1987; Oda, 1995).

⇒ Ein Hauptbestandteil der Untersuchungen war daher zunächst die Suche nach Fischarten, deren Spermien sich möglichst lange aktiv bewegen, sowie die Entwicklung und Verbesserung von Medien zur Verlängerung der natürlichen Motilitätsphasen. Im Verlauf des Projekts wurde dieser Schwerpunkt in Richtung des Einsatzes von Medien, die die inaktiven Spermien trotz Verdünnung in ihrem Ruhezustand belassen (**Immobilisierung**), verschoben. In diesen Immobilisierungslösungen sollte das Testgut (Chemikalien, Abwasser) gelöst und verdünnt werden. Damit sollte ein ausreichend langer Zeitraum für die Exposition mit ausgewählten Substanzen bzw. Abwasserproben geschaffen werden. Die immobilisierten und schadstoff-exponierten Spermien sollten dann nach Ablauf des Tests mit geeigneten Lösungen aktiviert werden. Der Grad der Beeinträchtigung ihrer Beweglichkeit (oder anderer zelltypischer Parameter (s.u.)) im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle sollte Aufschluss über die Giftigkeit des Testguts geben.

### 1.1.2 Verfügbarkeit der Spermaproben

Die Laichzeit der meisten europäischen Fischarten ist auf eine kurze, wenige Wochen dauernde Phase im Jahr beschränkt. In dieser Zeit verändern sich Reifegrad und Qualität des Spermas. Die beste Qualität ist in der Regel in der Mitte der Laichperiode zu erwarten. Hier können bis zu 100% der abgegebenen Spermien aktiviert und die längsten Motilitätsphasen gemessen werden (Billard 1986, Billard & Cosson, 1992). Ein standardisierbarer Biotest muss jedoch saisonunabhängig mit qualitativ einheitlichem Zellmaterial durchführbar sein.

⇒ Um die ganzjährige Verfügbarkeit sicherzustellen, lag ein zweiter Untersuchungsschwerpunkt auf der Konservierung des Fischspermas in flüssigem Stickstoff (LN<sub>2</sub>, -196°C). Hierzu war es nötig, geeignete Medien zur **Kryokonservierung** zu finden und zu erproben, sowie den Einfrier- und Auftauprozess zu optimieren. Es war u.a. zu beachten, dass die Eigenschaften der Zellen durch diese Prozesse verändert werden und für die Aktivierung aufgetauter Spermien eventuell andere Medien und/oder Mischungsverhältnisse eingesetzt werden müssen als bei nativen Proben.

### 1.1.3 Voraussetzungen für das Testverfahren

Ein geeignetes Biotestverfahren sollte möglichst schnell zuverlässige und empfindliche Ergebnisse liefern und dabei noch praktikabel und kostengünstig sein.

⇒ Die Eignung der in Frage kommenden Spermazellen für einen Fertilitätstest mit dem Endpunkt Motilität sollte mit verschiedenen ausgewählten Testsubstanzen geprüft werden. Dabei sollten frische als auch kryokonservierte Spermaproben zum Einsatz kommen. Das zu erarbeitende Testdesign sollte einen direkten Vergleich zwischen den Ergebnissen für frische und kryokonservierte Zellen ermöglichen. Die Methode sollte außerdem möglichst schnell, praktikabel und zuverlässig sein. Die mit den Fischspermien ermittelten Effektkonzentrationen sollten mit Werten aus standardisierten und etablierten aquatischen Testverfahren verglichen werden, wobei die Sensitivität des Fischspermientests gegenüber diesen Verfahren möglichst nicht abfallen sollte. Eine einfache Zellfärbemethode als Alternative zum Endpunkt Motilität sollte ebenfalls erarbeitet und bezüglich ihrer Eignung und Empfindlichkeit verglichen und bewertet werden.

### 1.1.4 Anforderungen an geeignetes Fischsperma

Zusammengefasst wurden folgende Anforderungen an das Sperma potentiell geeigneter Fischarten gestellt:

- Gute Qualität = möglichst hohe Motilitätsraten ( $\geq 70\%$  aktive Zellen)
- Verfügbarkeit von qualitativ guten Spermaproben in ausreichenden Mengen (mehrere ml pro Tier)
- Immobilisierbarkeit der Spermien in geeigneten Medien mit anschließender Aktivierung ohne Qualitätsverlust
- Gute Konservierbarkeit der Spermaproben mit möglichst hohen und stabilen Motilitätsraten nach dem Auftauen ( $\geq 50\%$  aktive Zellen)
- Möglichst geringe Qualitätsschwankungen von Probe zu Probe, von Fisch zu Fisch und von Jahr zu Jahr
- Gute Empfindlichkeit gegenüber den Testsubstanzen im Vergleich zu etablierten Biotestverfahren

### 1.2 Übersicht Voruntersuchungen

Nach umfangreicher Literaturrecherche, Expertenbefragung und einer Reihe von Voruntersuchungen kamen nur wenige Fischarten in Frage, die den oben genannten Anforderungen annähernd gerecht werden konnten. Aus unterschiedlichen Gründen als nicht oder wenig geeignet hatten sich Flussbarsch (*Perca fluviatilis*), Güster (*Blicca bjoerkna*), Sibirischer Stör (*Acipenser baerii*) und Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) erwiesen. Fischarten mit internaler Befruchtung, wie z.B. der Guppy, wurden aufgrund der Schwierigkeiten bei der Spermagewinnung und der geringen zu erwartenden Spermamengen von vornherein nicht berücksichtigt. Nach weiteren Untersuchungen mit Spermaproben von Dorsch (*Gadus morhua*), Hering (*Clupea harengus*), **Karpfen** (*Cyprinus carpio*), Kleiner Maräne (*Coregonus albula*), Steinbutt (*Scophthalmus maximus*), **Sterlet** (*Acipenser ruthenus*) und der Tilapienart *Oreochromis niloticus* erwiesen sich lediglich Karpfen- und Sterletspermien als geeignet, da sie als einzige in ausreichendem Maße verfügbar waren, gute Motilitätseigenschaften besitzen und gut kryokonservierbar sind.

### 1.3 Übersicht Hauptuntersuchungen

Bei den Hauptuntersuchungen an Karpfen- und Sterletspermien, deren Ergebnisse die Grundlage für die vorliegende Dissertation bilden, lassen sich zwei Teile unterscheiden. Im ersten Teil wurden in Abhängigkeit von der Laichzeit der beiden Arten (Sterlet: Februar – April; Karpfen: Juni – August) die grundsätzlichen **Motilitätseigenschaften** der Spermien untersucht. Motilitätsrate, -dauer, -geschwindigkeit und andere Motilitätsparameter, die mit Hilfe der computergestützten Videomikrographie (CASA: computer assisted sperm analysis) ermittelt werden konnten, wurden unter

Einsatz verschiedener Lösungen und Mischungsverhältnisse gemessen. Experimente zur Immobilisierbarkeit und zu einigen anderen Eigenschaften wurden ebenfalls durchgeführt.

Parallel dazu wurden Spermaproben unter verschiedenen Bedingungen, wie sie aus der Literatur oder aus Voruntersuchungen bekannt waren, **kryokonserviert**. Nach dem Auftauen wurden wiederum die Motilitätseigenschaften als Qualitätsmerkmal mit der CASA untersucht. Dabei wurde vor allem auf eine möglichst hohe Motilitätsrate geachtet. Geeignete bzw. vielversprechende Methoden wurden über mehrere Laichperioden getestet und optimiert.

Der zweite Teil der Hauptuntersuchungen beinhaltet die ökotoxikologischen Studien, die wiederum in drei Phasen aufgeteilt werden können. In der ersten Phase dieser Experimente wurden Toxizitäts-Vortests mit nativen Karpfen- und Sterletspermien zum **Endpunkt Motilität** durchgeführt. Dabei kamen vor allem folgende Substanzen zum Einsatz: Cadmium (Cd), 3,5-Dichlorphenol (3,5-DCP), Digitonin und Natriumdodecylsulfat (SDS). Als schnelle und einfache Alternativmethode wurde der **Endpunkt Membranintegrität** durch Anfärbung der Zell-DNA von nativen und kryokonservierten/aufgetauten Spermien erprobt.

Für die weiteren Phasen der ökotoxikologischen Studien wurde zunächst eine Neu-Auswahl für die Schadstoffe getroffen. Vier Schadstoffe unterschiedlicher Substanz- und Wirkungsklassen (Cd, Rotenon, 4-Nonylphenol (4-NP) und Crotonaldehyd) wurden ausgewählt und in den Phasen 2 und 3 getestet. Da Motilitätstests nur mit nativen Spermien durchführbar waren, wurde zusätzlich der **Endpunkt ATP-Gehalt** von nativen und kryokonservierten Spermazellen als Toxizitätsparameter untersucht. Im weiteren Verlauf der Untersuchungen (Phase 3) wurden die Testmethoden für native und kryokonservierte Zellen aneinander angeglichen, um die Vergleichbarkeit der Empfindlichkeiten gegenüber den Testsubstanzen (**EC50-Werte**) zu gewährleisten. In den letzten beiden Phasen der Experimente wurde nur noch Karpfensperma verwendet. Zum Abschluss der Untersuchungen wurden die entwickelten Testverfahren mit einer Abwasserprobe aus der chemischen Industrie als Testgut durchgeführt.

### 1.4 Zeitraum und Ort der Untersuchungen

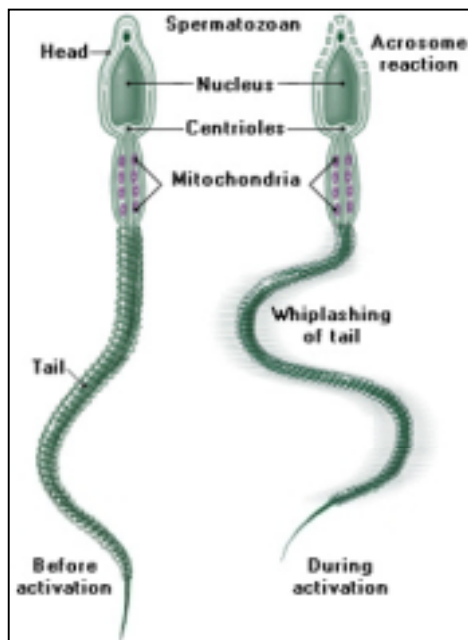
Die in dieser Dissertation vorgestellten Ergebnisse sind zu einem Teil innerhalb des vom UBA geförderten Forschungsprojekts (1995–1997) und zum anderen Teil während des anschließenden Promotionsvorhabens (1998/99) ermittelt worden. Der überwiegende Teil der praktischen Arbeiten wurde auf dem UBA-Versuchsfeld des ehemaligen Instituts für Wasser-, Boden- und Lufthygiene (WaBoLu) in Berlin-Marienfelde durchgeführt. Mit Ausnahme einer Probennahme und damit verbundener Experimente, die an der Bundesforschungsanstalt für Fischerei (BFA), Außenstelle

Ahrensburg stattfanden, stammen die Karpfenspermaproben von Tieren, die auf dem UBA-Versuchsfeld in Außenteichen gehältert werden. Die Gewinnung der Sterletspermaproben und die damit verbundenen Experimente wurden am Teichwirtschaftlichen Beispielsbetrieb Wöllershof in der Oberpfalz vorgenommen.

## 1.5 Literaturübersicht

### 1.5.1 Fischsperma

Grundsätzlich ist die Morphologie von Fischspermien ähnlich der von Säugerspermien (Abbildung 1). Hauptunterschiede betreffen das Mittelstück (Länge und Mitochondrienanzahl) und die Kopfkappe (Akrosom), die bei Echten Knochenfischen (Teleostei) nicht vorhanden ist. Spermien der Teleostei sind aus einem runden Kopf (2–5 µm Länge), der den Kern beinhaltet, einem kurzen Mittelstück mit wenigen Mitochondrien und einem Flagellum für die Fortbewegung aufgebaut. Bei Spermien von Cypriniden (Weißfischen) schwankt die Mitochondrienzahl zwischen zwei und zehn und die Länge des Flagellums zwischen 30 und 40 µm. Der Ansatzpunkt der Geißel am Kern kann anterior, posterior oder lateral sein. Die Struktur der Geißelmikrotubuli von Fischspermien ist mit Ausnahme von Aalspermien nach dem 9+2-Muster aufgebaut (Billard, 1990).



Quelle: Internet

Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Säugerspermiums (immotil/motil)

Die Morphologie von Störspermien und -eiern unterscheidet sich deutlich von der der Echten Knochenfische. Der Kopf der Störspermien ist länglich (Länge bis zu 10  $\mu\text{m}$ ) und trägt ein Akrosom (Kopfkappe), wie es auch Säuger- und Seeigelspermien besitzen. Beim Durchdringen der Mikropyle wird vom Spermium durch die akrosomale Reaktion ein ca. 10- $\mu\text{m}$ -langes Fertilisationsfilament gebildet. Zusätzlich werden Enzyme und Bindungsproteine ausgeschüttet, die für die Penetration der Eihülle notwendig sind. Die Eihülle enthält nicht nur eine Mikropyle - wie die der Echten Knochenfische -, sondern zwischen 3 und 15 am animalen Pol. Polyspermie wird durch eine schnelle kortikale Reaktion des Eies nach dem Kontakt des ersten Spermiums mit dem Oolemma verhindert (Cherr und Clark, 1985).

Spermatogenese und Spermiation bei Fischen hängen u.a. von den äußeren Faktoren Temperatur, Photoperiode und Sauerstoffgehalt ab (Billard, 1986; Chechun et al., 1994). Verantwortlich für die Unbeweglichkeit der unverdünnten Spermien ist bei Salmoniden die  $\text{K}^+$ -Konzentration, bei Cypriniden und marinen Fischen die Osmolarität des Seminalplasmas (Morisawa und Suzuki, 1980). Bei pH-Werten  $< 7$  tritt ebenfalls eine Hemmung ein. Die  $\text{K}^+$ -Konzentrationen, die bei Regenbogenforellen nötig sind, um die Motilität zu hemmen, variieren mit dem Verlauf der Laichzeit. Am Anfang und am Ende der Laichperiode liegt der Wert deutlich höher (bis zu 50 mM) als in der Mitte (um 5 mM) (Billard, 1986).

Die Spermienbewegung resultiert aus dem Ein- bzw. Aushaken eines Dyneinarms von einem Mikrotubulus zum benachbarten durch ATP-Hydrolyse. Stoffwechselphysiologisch ist die Initiationsreaktion der Motilität, also das Auslösen des Schwanzschlags, noch nicht bis ins Detail geklärt. Sicher ist, dass sich durch die Verdünnung im Salz- oder Süßwasser selektiv  $\text{K}^+$ -Ionenkanäle in der Zellmembran öffnen und eine Hyperpolarisation mit anschließender Depolarisation der Membran stattfindet (Morisawa und Ishida, 1987; Cosson et al., 1995).  $\text{Ca}^{2+}$  strömt in die Zelle ein und löst nach dem Second-Messenger-Prinzip eine Kettenreaktion aus, an deren Ende die Initiation der Spermienmotilität steht. Bei Forellenspermien führt der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom zu einer Erhöhung der Adenylatcyclaseaktivität und damit zum kurzzeitigen Anstieg der cAMP-Konzentration. Die darauf folgende Aktivierung einer Proteinkinase führt zu einer cAMP-abhängigen Phosphorylierung eines 15 KD-Proteins, welches in direkte Verbindung mit dem Auslösen der Schwanzbewegung gebracht wird. Ein paar Sekunden später steigt auch die Phosphodiesteraseaktivität an. In neueren Studien konnte gezeigt werden, dass das Auslösen der Motilität zumindest bei Karpfenspermien gänzlich cAMP-unabhängig ist (Perchee Poupard et al., 1997; Krasznai et al., 2000).

Die Schwanzschlagfrequenz beträgt anfänglich etwa 60 Hz und sinkt in Abhängigkeit von der ATP-Konzentration innerhalb von 20–30 s auf 20 Hz ab (Billard et al., 1987; Cosson et al., 1989). Die meisten Knochenfischspermien besitzen eine geringe mitochondriale Kapazität zur ATP-Synthese über oxidative Phosphorylierung (Christen et al., 1987). Daher wird vermutet, dass der größte Teil des ATP-Bedarfs vor dem Beginn der Motilitätsphase produziert und bereitgestellt wird (Perchee et al., 1995). Bei

Forellenspermien wird dennoch die ATP-Konzentration innerhalb von 15 min nach Ende des Bewegungsvorgangs wieder hergestellt, und die Motilität kann erneut ausgelöst werden (Christen et al., 1987). Bei Karpfensperma ist eine Regeneration nur durch längere Inkubation in einem Medium mit hoher Osmolalität ( $> 300 \text{ mosM/kg}$ ) möglich (Redondo-Müller et al., 1991; Perchec et al., 1995). Demembranierte Forellenspermien können durch ATP- und cAMP-Zugaben reaktiviert werden (Morisawa et al., 1983), Karpfenspermien brauchen dazu kein cAMP (Perchec et al., 1993).

### 1.5.2 Kryokonservierung

Der Einsatz von kryokonservierten Säugerspermien (z.B. von Rind, Pferd, Mensch) zum Zwecke der künstlichen Befruchtung ist schon seit einigen Jahren Routine. Durch langjährige Forschung ist es hier gelungen, Motilitätsraten von in der Regel deutlich über 50% nach dem Auftauen zu erreichen. Parks und Graham (1992) gaben einen Überblick über die kryobiologischen Erkenntnisse mit Säugerspermien. Zusammenfassend sind folgende Faktoren während des Einfrier- und Auftauprozesses zu beachten:

Beim Einfrieren reduzieren die Spermien ihr Zellvolumen durch den Wasserverlust um etwa die Hälfte. Im Gegensatz dazu vergrößert sich das Zellvolumen nach dem Auftauen auf das Doppelte des normalen isotonischen Zustands, wenn mit isotonischem Medium verdünnt wird. Die Schäden beim Einfrier- und Auftauprozess entstehen bei Temperaturen zwischen  $-15$  und  $-60^\circ\text{C}$ , jedoch nicht während der Lagerung in flüssigem Stickstoff ( $\text{LN}_2$ ). Der Hauptgrund für Gefrierschäden von Spermazellen liegt in der Schädigung der Plasmamembran durch thermischen, mechanischen, chemischen oder osmotischen Stress.

Seitdem Blaxter 1953 erstmals von erfolgreichen Versuchen zur Kryokonservierung von Fischsperma des Atlantischen Herings berichtet hat, ist eine Vielzahl von Arbeiten zu diesem Thema erschienen. Dabei handelt es sich überwiegend um empirische Untersuchungen zur Auswahl der geeigneten Kryomedien und Einfrierbedingungen bei verschiedenen Fischarten. Oft wurde dabei die Motilität der Spermien nach dem Auftauen als Qualitätskriterium herangezogen. Sie wurde noch bis weit in die 1990er Jahre überwiegend mit subjektiven (manuellen) Methoden ausgewertet. Das Hauptziel der meisten Untersuchungen war jedoch nicht, nach dem Auftauen eine möglichst hohe Motilitätsrate zu erreichen, sondern befriedigende Befruchtungserfolge für die Aquakultur zu erzielen. Eine weitere Optimierung der Einfrierbedingungen ist meistens unterblieben, da oft schon geringe Motilitätsraten nach dem Auftauen ausreichen, um gute Befruchtungsraten zu erhalten.

Um Missverständnisse auszuschließen, soll hier zunächst der Begriff „Kryomittel“, wie er in der vorliegenden Dissertation verwendet wird, erläutert werden: Das Kryomittel besteht aus einem Medium („Verdüner“ oder „Extender“) in dem ein internes (permierendes) Kryoprotektivum (z.B. DMA, EG,



DMSO, etc.) in bestimmten Anteilen (meistens zwischen 10 und 20%) gelöst ist und optional aus anderen Zusätzen, die in der Regel als externe Kryoprotektiva (z.B. Zucker oder Proteine) wirken sollen. Das Kryomittel wird mit dem Sperma in Verhältnissen von 1:2 bis 1:10 vermischt und eingefroren.

Dass eine Spermaaufbewahrung unter geeigneten Bedingungen (kühle Lagerung, Antibiotikazugabe) in der Regel über mehrere Tage möglich ist, wurde sowohl für Karpfen- (Saad & Billard, 1988; Jähnichen, 1992) als auch für Störsperma (DiLauro et al., 1994; Brown & Mims, 1995) belegt.

Die Langzeitkonservierung von Fischsperma hatte wechselnden Erfolg. Viele Publikationen zur Kryokonservierung von Karpfensperma berichteten allerdings von guten Motilitäts- und/oder Fertilitätsergebnissen mit DMSO als internem Kryoprotektivum (Kurokura et al., 1984; Gwo et al., 1993; Magyary et al., 1996a,b; Linhart et al., 2000; Lahnsteiner et al., 2000). In Vergleichsstudien mit anderen Kryoprotektiva (Glyzerin, Ethylenglycol und Propandiol) erzielte es einerseits bessere Resultate (Moczarski et al., 1977; Koldras and Bieniarz, 1987; Cognie et al., 1989), wohingegen andere Arbeiten von vergleichsweise besseren Kryoeerfolgen mit Methanol (Leveroni Calvi et al., 1993), Glyzerin (Lakra and Krishna, 1997) und DMA (Babiak et al., 1997) berichteten.

Eine Reihe vielversprechender Methoden wurde in Vorversuchen zur vorliegenden Arbeit an Karpfenspermien getestet. Unter den vorhandenen Bedingungen waren die Motilitätsraten nach dem Auftauen, die mit den oben zitierten Methoden bzw. Kryomitteln erzielt wurden, nicht den Erwartungen entsprechend. Einzig mit DMA als Kryoprotektivum konnten Motilitätsraten von über 30% nach dem Auftauen erreicht werden. Die Effektivität von DMA als Kryoprotektivum wurde zuerst von McNiven et al. (1993) für Sperma von Regenbogenforellen berichtet. Für Kryoversuche mit Karpfensperma kombinierten Babiak et al. (1997) DMA mit Kurokura-Medium und Eidotter. Mit diesem Kryomittel konnten sie gute Motilitäts- und Befruchtungsergebnisse erzielen.

Inzwischen ist DMA für die Kryokonservierung von Sperma diverser Fischarten getestet worden, wobei erfolgreiche Kryomittel oft Zucker wie Sucrose (= Saccharose), Fructose oder Glucose als kryoprotektiven Zusatz in Konzentrationen zwischen 100 und 600 mM enthielten (Babiak et al., 1997; Gwo et al., 1999; Ogier de Baulny, 1999; Glogowski et al., 1999; Richardson et al., 2000; Horvath and Urbanyi, 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde DMA vor allem in Kombination mit Sucrose (Saccharose) und Trehalose in Konzentrationen von 100 bis 300 mM getestet.

Es gibt nur sehr wenige Arbeiten zur Kryokonservierung von Störsperma. So untersuchten Ciereszko et al. (1996) mit CASA-Methoden die Spermienmotilität vom Seestör (*Acipenser fulvescens*) vor und nach dem Einfrieren, wobei sie dafür ein Kryomittel bestehend aus 10% DMSO und 0,6 M Sucrose verwendeten. Nach dem Auftauen erzielten sie Motilitätsraten von maximal etwa 20%. Allerdings erreichten die frischen Spermien vor dem Einfrieren nur Werte von ca. 45%. Tsvetkova et al. (1996)

erzielten nach der Kryokonservierung ähnlich niedrige Motilitätsraten von  $23\pm 8\%$  mit Sperma vom Sibirischen Stör (*Acipenser baerii*) und  $15\pm 11\%$  mit Sperma vom Sterlet (*A. ruthenus*). Als Kryomittel verwendeten sie ebenfalls DMSO in Kombination mit Sucrose und Eidotter. In früheren Arbeiten wurde zwar von Motilitätsraten von bis zu 90% unter Verwendung des gleichen Kryomittels berichtet (Cherepanov et al., 1993; Drokin et al., 1993), jedoch fehlten hier genaue Angaben über die angewendete Methode.

Ähnlich wie beim Karpfensperma wurden mit den DMSO-Methoden auch beim Sterletsperma unter den gegebenen Bedingungen keine befriedigenden Motilitätsraten nach dem Auftauen gemessen. Andere Kryoprotektiva wie DMA, Propandiol, Glycerin und Methanol ergaben ebenfalls keine besseren Resultate. Einzig mit Ethylenglycol (EG) konnten befriedigende Kryoergebnisse erzielt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde es in Endkonzentrationen von 12,5–25% geprüft.

### 1.5.3 Videomikrographie

Die computergestützte Videomikrographie (CASA: computer assisted sperm analysis) ist ein automatisiertes Messverfahren zur objektiven Charakterisierung und Vermessung von mikroskopischen Objekten. Sie wurde u.a. für die Bewegungsanalyse von Säugerspermien (Mensch, Rind, Schaf, etc.) entwickelt. Das Messprinzip ist Folgendes:

Die zu beurteilende, meist verdünnte Spermaprobe wird in eine Messkammer unter ein geeignetes Mikroskop (z.B. Phasenkontrast) gegeben. Mittels einer damit verbundenen Videokamera und eines Videorekorders wird die Motilität der Spermatozoen aufgezeichnet. Jeder beliebige Ausschnitt der Aufzeichnung kann dann bei Bedarf mit Hilfe eines Computers analysiert werden. Durch den negativen Phasenkontrast erscheinen die Spermien hell auf dunklem Hintergrund. Bei der Computerauswertung werden die Aufnahmen digitalisiert und den Spermienköpfen werden einzelne Bildpunkte (Pixel) zugeordnet.

Ein solches Bildanalyseprogramm wurde erstmals von Liu und Warne 1977 entwickelt. Amann und Hammerstedt (1980) wiesen in einer der ersten Arbeiten zur computerunterstützten Ejakulatanalyse auf die Notwendigkeit eines objektiven Meßsystems hin. Bis dahin wurde immer noch weitgehend nach der subjektiven Methode von Leeuwenhoek aus dem Jahre 1677 gearbeitet. Makler (1978a,b) entwickelte eine 10 µm tiefe Messkammer, die eine dreidimensionale Bewegung der Spermien verhindert, ohne dass die Beweglichkeit zu sehr eingeschränkt wird. Dadurch wird eine gleichmäßig scharfe Abbildung aller Spermien im Blickfeld erreicht. Auger und Dadoune (1988) testeten den Einsatz der Videomikrographie

bei kryokonservierten/aufgetauten Humanspermien. Für die technische Reproduzierbarkeit der Methode errechneten sie einen Wert von mindestens 70 motilen Zellen pro Messergebnis.

### 1.5.4 Ökotoxikologische Ansätze mit Spermien

#### 1.5.4.1 Spermienmotilität

Seibert et al. (1989) setzten die computergestützte Videomikrographie erstmals für toxikologische Studien an Rinderspermien ein und schlugen sie als Testsystem zur Gefährdungsabschätzung von Chemikalien vor. In einem vom Umweltbundesamt in Auftrag gegebenen Forschungsvorhaben wurde untersucht, ob die Motilitätseigenschaften von kryokonservierten/aufgetauten Rinderspermien ein geeignetes Modell für einen Toxizitätstest mit Umweltchemikalien sind (Nehring et al. 1994). Hierfür wurden 44 nach dem Zufallsprinzip ausgewählte Chemikalien eingesetzt. Die Spermengeschwindigkeit erwies sich im Vergleich zu anderen gemessenen Motilitätsparametern als empfindlichster Endpunkt. Rinderspermien zeigten zwar gegenüber einigen Chemikalien Reaktionen, die mit anderen ökotoxikologischen Testsystemen nicht zu messen waren, insgesamt waren sie jedoch unempfindlicher als vergleichbare Testobjekte.

Außer mit Rinderspermien gibt es ökotoxikologische Studien an Seeigelspermien, die z.T. bereits standardisiert sind und von der U.S.-amerikanischen Umweltbehörde (EPA) als Biotests eingesetzt werden (Dinnel et al., 1989). Seeigel leben ausschließlich im Meer und sind in Deutschland lebend nur schwer verfügbar. Sie können zwar in Laboratorien gehältert werden, benötigen aber aufgrund ihrer Lebensweise eine umfangreiche Betreuung, so dass sie insgesamt als Untersuchungsobjekte für die vorliegende Arbeit nicht in Frage kamen.

An Fischspermien sind bisher nur wenige toxikologische Untersuchungen durchgeführt worden. Eine Studie, die zur Auswertung ebenfalls die CASA benutzte, stammt von Kime et al. (1996). Sie testeten die Wirkung von Cadmium- und Zinksalzen sowie deren Kombination auf Spermien vom Afrikanischen Kiemensackwels (Catfish, *Clarias gariepinus*).

In einer aktuellen Publikation wurden den Auswirkungen von TBT auf die Spermien von Karpfen und Kiemensackwelsen verglichen (Rurangwa et al., 2002). Ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit wurden als Endpunkte die Motilität (vor allem die VCL-Geschwindigkeit), der Adenylat-Gehalt (ATP-, ADP- und AMP-Konzentration) und die Zellvitalität durch Färbung mittels Trypan-Blau nach 0 und 24 h Expositionsdauer getestet. Karpfenspermien reagierten dabei gegenüber TBT insgesamt unempfindlicher als die Catfish-Spermien.

#### 1.5.4.2 ATP-Gehalt

ATP ist der wichtigste Energielieferant in eukaryotischen Zellen und wird durch oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien hergestellt. Der Zusammenhang zwischen ATP-Gehalt und Beweglichkeit von Fischspermazellen ist besonders für Karpfen- und Forellenspermien gut untersucht. Solange sich die Spermien im Seminalplasma im Ruhezustand befinden sind die ATP-Speicher gefüllt (Christen et al, 1987; Perchee et al., 1995)). Bei Karpfenspermien sinken ATP-Konzentration und Kopfschlagfrequenz innerhalb von einer Minute nach dem Auslösen der Beweglichkeit von etwa 12 auf 4 nM/10<sup>8</sup> Zellen bzw. von 50–60 Hz auf 10–20 Hz. Die Spermengeschwindigkeit nimmt ebenso rasch ab (Perchee et al., 1993; 1995). Ist Ca<sup>2+</sup> in millimolaren Konzentrationen vorhanden, kann die Beweglichkeit der Zellen verlängert werden, bis der ATP-Vorrat komplett verbraucht ist. Eine Regeneration der Zellen ist dann nicht mehr möglich. Ohne Ca<sup>2+</sup>-Anwesenheit sinkt der ATP-Gehalt nicht bis auf Null, und ATP kann durch oxidative Phosphorylierung wieder bereit gestellt werden (Christen et al., 1987). Dies ist besonders in Medien mit hoher Osmolarität bzw. hoher K<sup>+</sup>-Konzentration gegeben. Wahrscheinlich werden dadurch die Dynein-ATP-Hydrolasen gehemmt und durch Mitochondrienatmung kann frisches ATP zur Verfügung gestellt werden. Wird die Mitochondrienatmung z.B. durch KCN (10 mM) gehemmt, sinkt die ATP-Konzentration unabhängig vom Medium (Christen et al., 1987; Perchee et al., 1995).

Bei Störspermien fehlt der direkte Zusammenhang zwischen ATP-Gehalt und Motilität. Die ATP-Konzentration im Sperma vom Sibirischen Stör (*Acipenser baerii*) liegt mit 6–10 nM/10<sup>8</sup> Zellen deutlich niedriger als die von Karpfen oder Forelle, die Motilitätsphase ist jedoch wesentlich länger. Offenbar können die Spermatozoen vom Stör während des Bewegungsvorgangs genügend Energie bereitstellen und sind weniger auf ihre ATP-Vorräte angewiesen (Billard et al., 1999).

Im Gegensatz zu vielen anderen Spermaeigenschaften schwankt der ATP-Gehalt im Fischsperma innerhalb der Laichperiode nicht besonders stark (Billard et al., 1995; Suquet et al., 1998). Perchee Poupard et al. (1998) zeigten jedoch, dass schon geringe Mengen an Verunreinigungen durch Urin ausreichen, um den ATP-Gehalt in frischem Karpfensperma innerhalb von einer Stunde um die Hälfte zu reduzieren. Auf Eis kann sauber abgestreiftes Karpfensperma jedoch über mehrere Stunden aufbewahrt werden, ohne dass es zu einem nennenswerten ATP-Verlust kommt (Billard et al., 1995).

Dreanno et al. (1997) verglichen den ATP-Gehalt von frischen und kryokonservierten Steinbuttpermien im immotilen Zustand sowie nach Aktivierung miteinander. Im nicht-aktivierten Zustand enthielten die eingefrorenen/aufgetauten Spermien ca. 40% weniger ATP als die frischen. Sechzig Sekunden nach Aktivierung lag der ATP-Gehalt ungefähr auf dem gleichen Niveau (Abnahme um ca. 73% verglichen mit den nativen, nicht-aktivierten Spermien). Ogier de Baulny et al. (1997) zeigten an Forellenspermien (*Oncorhynchus mykiss*), dass u.a. der Grad des ATP-Verlusts bei der Kryokonservierung durch Art und

Konzentration des Kryomittels beeinflussbar ist. In kryokonservierten Spermaproben vom Wels (*Silurus glanis*) wurde sogar gemessen, dass einige Kryomittel (z.B. auch DMA in Kombination mit Sucrose - ähnlich wie es in der vorliegenden Arbeit für Karpfenspermien verwendet wurde) den ATP-Gehalt im Vergleich zu frischen Spermien erhöhen können (Ogier de Baulny et al., 1999).

Außer der bereits oben erwähnten Arbeit von Rurangwa et al. (2002) sind ökotoxikologische Studien zur Beeinflussung des ATP-Gehalts von Fischspermien durch Umweltschadstoffe nicht bekannt.

### **1.5.4.3 Membranintegrität**

Seit einiger Zeit werden Zellfärbemethoden auch an Fischspermien getestet, um Qualitätskontrollen zur Zellintegrität durchzuführen. Marian et al. (1993) färbten mit dem DNA-Fluoreszenzfarbstoff Propidiumjodid Karpfenspermien an, die durch Verdünnung einem hypo-osmotischen Schock ausgesetzt waren. Sie konnten zeigen, dass der Anteil an gefärbten Zellen von der Dauer des Schocks und der Osmolarität des Verdünnungsmediums abhängen. Auch kryokonservierte Spermien wurden durch Zellfärbung und Vergleich mit frischen Proben einer Qualitätskontrolle unterzogen (Ogier de Baulny et al., 1997, 1999; Rurangwa et al. 1998, 2001).

Ökotoxikologische Studien an Fischspermien unter Chemikalieneinwirkung mit dem Endpunkt Membranintegrität sind bisher nicht durchgeführt worden.

### **1.5.4.4 Sonstige ökotoxikologische Studien**

In einer neueren Studie wurde die Geschwindigkeit der Reduktionsreaktion von Resazurin zu Resorufin als Toxizitätsparameter für Spermien von Seeigeln (*Strongylocentrotus droebachiensis*, Grüner Seeigel) Muscheln (*Placopecten magellanicus*, Kammuschel) und Fischen (*Mallotus villosus*, Lodde) fluorometrisch untersucht und mit der mitochondrialen Atmungsrate von Seeigelspermien und Rattenleberzellen verglichen. Der ermittelte EC50-Wert des Resazurin-Tests mit Seeigelspermien nach Exposition mit TBT war um etwa das 100-fache niedriger als die der mitochondrialen Atmungsrate (0,09 mg/l gegenüber 9,25 mg/l) (Hamoutene et al., 2000).