

2 Material und Methoden

In der vorliegenden Arbeit sind alle angegebenen Konzentrationen Nominalwerte. Alle Substanzverdünnungen und Spermamischungen sind volumenbezogen (v/v). Bei Angabe der Testsubstanz-Konzentrationen ist die Verdünnung durch das Sperma berücksichtigt, d.h. es sind Endkonzentrationen. Bei Konzentrationen in Aktivierungslösungen oder von Kryoprotektiva und -zusätzen beziehen sich die angeführten Werte auf die entsprechende Lösung vor dem Mischen mit dem Sperma.

Abbildung 2 gibt einen Überblick über die verschiedenen Behandlungen des Fischspermas vom Abstreifen bis zur Bestimmung der Endpunkte. Für die Motilitätsanalyse wurde das native Sperma entweder direkt mit einer Initiatorlösung aktiviert oder in einem Zwei-Schritt-Verfahren zunächst mit einer Immobilisierungslösung vorverdünnt und dann aktiviert. Für die Bestimmung der Endpunkte wurden die Spermien in jedem Fall immobilisiert, da in der Immobilisierungslösung die Substanzen bzw. das Abwasser gelöst und verdünnt wurden und die Lösung gleichzeitig als Kontrolle diente. Wurden kryokonservierte Zellen in den Substanztests eingesetzt, wurden diese sofort nach dem Auftauen mit der Immobilisierungslösung verdünnt. Danach wurde genauso verfahren wie mit nativen Proben.

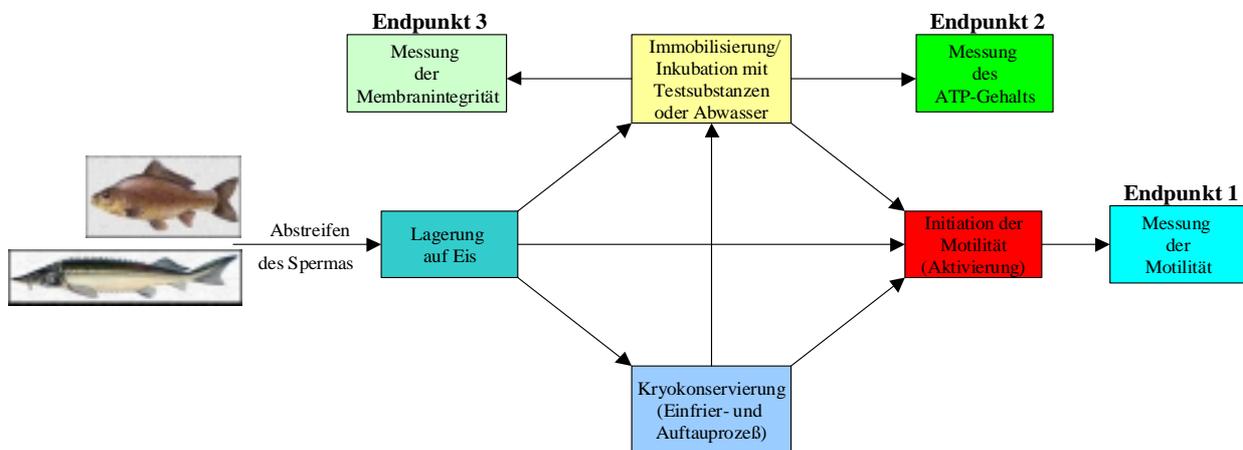


Abbildung 2: Behandlungen des Fischspermas für die Motilitätsanalyse und die Substanztests

2.1 Versuchstiere

2.1.1 Karpfen (*Cyprinus carpio* L.)

Die Wildform des Karpfens ist in den Zuflüssen des Mittel-, Schwarzen- und Kaspischen Meeres sowie des Aralsees beheimatet. Die mitteleuropäischen Populationen sind überwiegend Zuchtformen und bewohnen stehende und langsam fließende Gewässer mit Pflanzenbeständen. In Abhängigkeit von der Wassertemperatur ($> 20^{\circ}\text{C}$) werden die Tiere in den natürlichen Gewässern zwischen Mai und Juli laichreif. Die Weibchen legen dann ihre Eier an Pflanzen ab, die von den Männchen sofort befruchtet werden (Müller, 1983). Je nach Reifegrad kann in dieser Zeit von laichreifen Männchen eine Spermamenge von mehreren Millilitern je Kilogramm Körpergewicht (ml/kg) abgestreift werden.

Die Gewinnung der Karpfengameten erfolgte durch Abstreifen laichreifer Männchen auf dem UBA-Versuchsfeld Berlin-Marienfelde, wo die Fische in künstlich angelegten Teichen gehalten werden.



Abbildung 3: Spiegelkarpfen (*Cyprinus carpio*)

Während der Sommermonate wurden etwa 20 Männchen und Weibchen (Alter: 4–6 Jahre) zusammen in 5000-l-Rundbecken mit durchfließendem Teichwasser gehalten. Da bei Karpfen (Abbildung 3) durch Warmwasserhaltung das ganze Jahr hindurch qualitativ gutes Spermium abgestreift werden kann, wurden die Tiere im Herbst und Winter in einer Halle in Rundbecken mit temperiertem Frischwasser ($20 \pm 2^{\circ}\text{C}$) untergebracht. Die Fische wurden täglich mit Pellets gefüttert. Zwei Tage vor dem geplanten Abstreifen wurde die Fütterung vorübergehend eingestellt, um die Gefahr der Verunreinigung des Spermiums durch Kot und Urin zu minimieren. Jeweils 3–5 laichreife Tiere wurden 24 h vorher hypophysiert. Hierfür wurden getrocknete, kleingemörserte und in physiologischer Salzlösung (0,65%) aufgenommene Karpfenhypophysen intramuskulär (Rücken) injiziert. Männchen erhielten als einmalige Dosis 1–2 mg Hypophysenextrakt je kg Körperfrischmasse. Die Weibchen bekamen 4–5 mg/kg in zwei Portionen, wobei 10% der

Gesamtmenge 24 h vor dem Abstreifen injiziert wurden und 10 h davor die restlichen 90%. Bei hormonell stimulierten Karpfen erreichte das Volumen des abgestreiften Spermas Werte von über 10 ml/kg•d.

2.1.2 Sterlet (*Acipenser ruthenus* L.)

Diese Fischart aus der Familie der Störe (*Acipenseridae*) gilt wie alle anderen Störarten in unseren heimischen Gewässern als ausgestorben. Gründe hierfür sind vor allem eine massive Überfischung, die Verbauung der Flüsse und die Gewässerverschmutzung (Hochleitner, 1996; Reichle, 1997). Hin und wieder werden Störe in deutschen Gewässern gefangen. Diese stammen jedoch meistens aus Zuchtanlagen oder sind z.B. von Anglerverbänden ausgesetzt worden (mdl. Mitteilung J. Geßner, Gesellschaft zur Rettung des Störs e.V.).



Abbildung 4: Sterlet (*Acipenser ruthenus*)

Störe sind ausschließlich Bewohner der nördlichen Hemisphäre und gehören zur Überordnung der Knorpelganoiden, einer Schwestergruppe der Teleostei. Sie leben im Süßwasser oder sind anadrome Wanderfische. So wandert z.B. der Gemeine Stör (*Acipenser sturio*) nach Erreichen der Geschlechtsreife mit etwa 10 Jahren im Frühjahr aus dem Meer zu den Laichplätzen in den Flüssen. Über Kies und Geröll legen die Weibchen dann bis zu 2,5 Mio. Eier ab, die von den Männchen besamt werden. Die Larven bzw. Jungfische bleiben 1–2 Jahre im Süßwasser, wo sie sich - wie später im Meer - von wirbellosen Bodentieren ernähren. Der Sterlet (Abbildung 4) ist die kleinste Störart, wird bereits nach 3–5 Jahren geschlechtsreif und bleibt zeitlebens im Süßwasser (Müller, 1983).

Spermaproben vom Sterlet wurden freundlicherweise vom Teichwirtschaftlichen Beispielsbetrieb Wöllershof (Bezirk Oberpfalz; Fischzuchtmeister Bergler) zur Verfügung gestellt. Die Sterlets wurden im Februar aus den Außenteichen für einige Zeit in wärmeres Wasser (17–18°C) überführt. Wie die Karpfen wurden die Tiere vor dem geplanten Abstreifen hypophysiert. Unmittelbar vor dem Abstreifen wurden die Fische betäubt und die Genitalpore bis zur Spermaabnahme mit dem Finger verschlossen. Das Alter der abgestreiften Tiere betrug vier bis sechs Jahre.

2.2 Allgemeine Vorgehensweise

2.2.1 Gewinnung von Ei- und Samenzellen

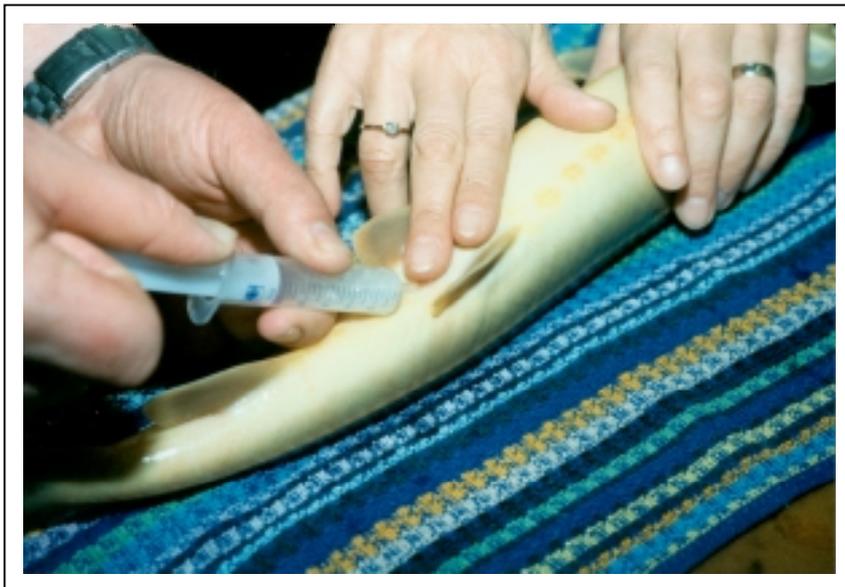


Abbildung 5: Spermaabnahme beim Sterlet

Das Abstreifen der Fischgameten erfolgte durch leichte Massage der Bauchdecke, wodurch die Eier bzw. Spermien aus der Genitalpore gedrückt wurden. Das Sperma wurde in 10-ml-Einwegspritzen aufgezogen (Abbildung 5). Die Eier wurden in geeigneten Schalen aufgefangen. Beim Abstreifen wurde darauf geachtet, dass die Gameten nicht durch Wasser, Kot, Urin oder Schleim verunreinigt wurden. Die Eier wurden innerhalb einer Stunde befruchtet und bei $20\pm 1^\circ\text{C}$ aufbewahrt und erbrütet. Das frisch abgestreifte Sperma wurde sofort auf Eis gelagert. Alle weiteren Spermabehandlungen wurden auf Eis und mit kalten Lösungen durchgeführt.

2.2.2 Motilitätsanalyse

Die Spermienbeweglichkeit wurde mittels computergestützter Videomikrographie (CASA) analysiert (Abbildung 6). Hierfür wurde zunächst ein Teil des frischen oder aufgetauten Spermias in einem Reaktionsgefäß (1,5 ml) mit einer Initiatorlösung (= Aktivierungslösung, s.u.) versetzt. In vielen Fällen wurde das Sperma auch in einer Immobilisierungslösung (s.u.) vorverdünnt und sofort danach bzw. nach einer versuchsabhängigen Inkubationszeit aktiviert. Aus der aktivierten Probe wurden sofort einige μl in eine unter dem Mikroskop (*Nikon Optiphot-2*, negativer Phasenkontrast) befindliche Messkammer (*Stroemberg/Mika*, Tiefe 10 μm) überführt. Eine Stoppuhr wurde gestartet, um die Motilitätsdauer zu ermitteln. Der Mikroskoptisch und die Messkammern wurden über ein Peltierelement temperiert: für Karpfenspermien auf $15\pm 2^\circ\text{C}$ und für Sterletspermien auf $10\pm 2^\circ\text{C}$. Die Motilität der Spermien wurde über eine Videokamera (*Panasonic wv-BL600*) und einen S-VHS – Videorekorder (*Panasonic AG-7350*) aufgezeichnet (Gesamtvergrößerung: 320-fach). Die Dauer der Aufnahme betrug in Abhängigkeit von der Qualität und Bewegungsphase der Spermazellen zwischen einer (Karpfen) und fünf (Sterlet) Minuten. Die Videoaufnahmen wurden zu einem späteren Zeitpunkt mit einem Bildanalyseprogramm (*mika motion analyzer V1.51 für Windows*) ausgewertet.

Zur Motilitätsbewertung der Spermaproben wurden Videosequenzen zu bestimmten Zeitpunkten der Motilitätsphase analysiert (z.B. nach 20, 40 und 60 s). Zu jedem Messzeitpunkt wurden drei aufeinander folgende Videosequenzen à 640 ms (32 Einzelaufnahmen à 20 ms) vom Messprogramm so ausgewertet, dass wenigstens 200 Zellen erfasst, analysiert und die Daten gemittelt werden konnten. Von jeder frischen Spermprobe bzw. von jedem Versuch mit frischen Proben wurden 4–5 Wiederholungsmessungen (Parallelen) durchgeführt. Von kryokonservierten Proben wurden mindestens drei Aliquots à 0,2–0,25 ml aufgetaut (s. auch 2.2.3 Kryokonservierung), Kryokonservierung die wiederum jeweils dreimal analysiert wurden. Ergebnisse sind in der Regel als Mittelwert mit Standardabweichung angegeben.

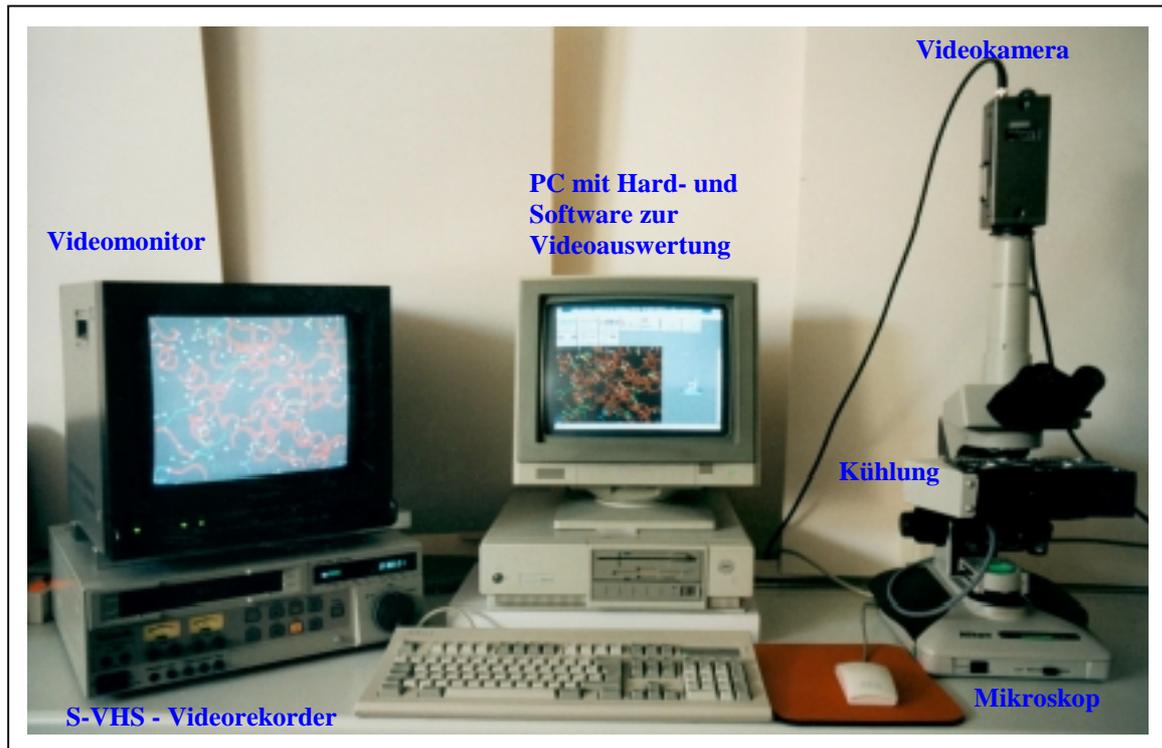


Abbildung 6: Verwendetes System für die computergestützte Videomikrographie (CASA)

Die für die Charakterisierung der Spermienmotilität erforderlichen Messparameter und Klassifizierungen waren programmseitig voreingestellt und sind in Tabelle 1 und Tabelle 2 aufgeführt. Die Motilitätsergebnisse wurden in einer Datenbank (*Paradox für Windows V5.0*) gespeichert und archiviert. Als Interface zwischen Messprogramm und Datenbank diente das Programm *Mika Database V1.5c*.

Tabelle 1: Messparameter und ihre Bedeutung

Parameter (Abkürzung)	Bedeutung/Definition	Einheit
Motilitätsrate (Mot)	Anteil motiler Zellen	%
Curve line velocity (VCL)	Geschwindigkeit entlang der tatsächlichen Bahn	$\mu\text{m/s}$
Averaged path velocity (VAP)	Geschwindigkeit entlang der gemittelten Bahn	$\mu\text{m/s}$
Straight line velocity (VSL)	Geschwindigkeit entlang der Luftlinie	$\mu\text{m/s}$
Lateral head displacement (LHD)	Seitliche Kopfauslenkung	μm
Beat frequency (BF)	Kopf-/Schwanzschlagfrequenz ¹	Hz
Linearity (Lin)	Linearität = VSL/VCL	%
Straightness (Str)	Geradlinigkeit = VSL/VAP	%

¹ Da dieser Wert bei Frequenzen von mehr als 25 Hz - die bei Fischspermien anfänglich deutlich höher liegen können - mit der vorhandenen 50 Hz - Kamera nicht korrekt ermittelt werden konnte (hiefür sind Videokameras mit mehr als doppelt so hoher Bildaufnahmefrequenz erforderlich), wird in der vorliegenden Arbeit auf eine Angabe dieses Parameters verzichtet.

Tabelle 2: Klassifizierung der Spermien

Klasse	Bedingung
Immotile (IM)	$\text{VAP} < 10 \mu\text{m/s}$
Lokal Motile (LoM)	$\text{VAP} > 10 \mu\text{m/s}$ und $< 30 \mu\text{m/s}$
Motile (M)	$\text{VAP} > 30 \mu\text{m/s}$
Unterklasse	
Linear Motile (LM)	motil, nicht-hyperaktiv und Geradlinigkeit $> 90\%$
Nicht-linear Motile (NLM)	motil, nicht-hyperaktiv und Geradlinigkeit $< 90\%$
Hyperaktive (H)	motil, $\text{VCL} > 80 \mu\text{m/s}$, Linearität $< 65\%$ und Kopfauslenkung $> 6,5$
Kreisläufer (KL)	motil, keine andere Motilitätsklasse und Bahnradius $< 8 \mu\text{m}$

2.2.3 Kryokonservierung

Vor dem Einfrieren wurde die Qualität der Spermabproben in einem Aliquot nach dem oben beschriebenen Verfahren überprüft. Nur Spermabproben mit hohen Motilitätsraten (>70%) wurden für Einfrierversuche verwendet. Waren mehrere Proben mit guter Qualität vorhanden, wurde eine Mischprobe („Mix“) hergestellt, um größere Mengen zur Verfügung zu haben. Die ausgewählte Spermabprobe wurde anschließend mit dem Kryomittel versetzt.

Nach einer Equilibrierphase von 2–20 min wurden die Proben in 0,25-ml-Einfrierpailletten (engl.: Straws = ca. 15 cm lange, strohhalm-ähnliche Kunststoffröhrchen) aufgezogen, wobei je Spermabehandlung mindestens drei farblich gleiche Pailletten verwendet wurden. Mit Hilfe eines automatischen Einfriergerätes (Cryocell 1200, Fa. Sylab) wurden die Proben schrittweise bis -80°C eingefroren. Das Fassungsvermögen des Einfriergerätes betrug 20 Pailletten. Zwei verschiedene Gefrierprofile wurden programmiert, die sich in der Einfriergeschwindigkeit unterschieden. Um noch schnellere Gefrierarten zu erreichen, wurde Gefrierprofil III in einer Aluminiumwanne über flüssigem Stickstoff durchgeführt. Der Abstand zum LN₂ wurde so gewählt, dass die Temperatur auf der Oberseite der Aluminiumwanne etwa -50°C betrug. Die einzufrierenden Spermabproben wurden in den Pailletten für 20 min auf der Aluminiumwanne belassen. Alle Proben wurden am Ende der kontrollierten Gefriervorgänge sofort in flüssigen Stickstoff (LN₂, -196°C) überführt und bis zum Auftauen darin gelagert (Tabelle 3).

Tabelle 3: Eingesetzte Gefrierprofile

Profil	1. Schritt	2. Schritt	3. Schritt	Mittlere Gefrierrate bis -196°C [°C/min] ¹
I	+2 bis -7°C: 5°C/min	-7 bis -30°C: 3°C/min	-30 bis -80°C: 2°C/min	6
II	+2 bis -7°C: 0,5°C/min	-7 bis -30°C: 1°C/min	-30 bis -80°C: 2°C/min	3
III	+2 bis -50°C in einem Schritt (Details s. Text)			10

¹nach Beendigung des letzten Gefrierschritts wurden die Proben direkt in fl. Stickstoff (-196°C) getaucht

Aufgetaut wurden alle Proben durch Eintauchen in ein Wasserbad für 3–5 s bei 40±1°C. Die aufgetauten Proben wurden sofort in Reaktionsgefäße überführt und auf Eis aufbewahrt. Innerhalb von maximal etwa 10 Minuten wurde die Motilität der aufgetauten Probe wie unter Punkt 2.2.2 beschrieben analysiert.