

## 4 Diskussion

### 4.1 Teil I: Motilität, Kryokonservierung und Befruchtung

#### 4.1.1 Bewertung der Fischarten

##### 4.1.1.1 Karpfen

Nach relativ großen Schwankungen der Spermaqualität in den ersten beiden Jahren des Projekts konnten durch hormonelle Stimulierung (Hypophysierung) der Karpfen konstant gute Spermaqualitäten und -mengen erreicht werden. Zur Laichzeit gaben viele der hypophysierten Tiere täglich bis zu 10 ml/kg von guter bis sehr Qualität (Motilitätsraten um 70–90%). Im weiteren Verlauf der Untersuchungen wurden von Karpfen, die nach Ende des Sommers in einer Halle in temperierten Becken (20–22°C) gehalten worden waren, im Herbst und Winter ausreichende Spermamengen von gleichbleibend guter Qualität gewonnen.

##### 4.1.1.1.1 Motilität und Temperaturabhängigkeit

Die im Ergebnisteil dargestellten Motilitätseigenschaften sind, wie bereits erwähnt, aufgrund der qualitativen Vorauswahl weder für das Sperma der untersuchten Karpfenpopulation repräsentativ, noch für Karpfensperma im allgemeinen. Dennoch decken sich die Ergebnisse zum größten Teil mit den gefundenen Literaturwerten. So liegen die Literaturdaten zur Osmolalität des Seminalplasmas mit  $258 \pm 20$  mosM/kg (Redondo-Müller et al., 1991),  $254 \pm 17$  mosM/kg (Toth et al., 1995) und  $270 \pm 16$  mosM/kg (Ravinder et al., 1997) in einem ähnlichen Bereich wie die hier ermittelten ( $257 \pm 31$  mosM/kg).

Weitere Vergleichszahlen gibt es aus einer CASA-Studie zu saisonalen Schwankungen (März bis August) der Motilitätsparameter von Karpfensperma (Christ et al., 1996). Die dort angegebene Osmolalität des Seminalplasmas der hypophysierten Karpfen von 250–265 mosM/kg entspricht der hier gefundenen, ebenso die Zellkonzentration ( $9,6\text{--}27,4 \cdot 10^9$  Spz/ml), die zu Beginn der Laichzeit noch relativ niedrig ist. Die maximal abgestreifte Spermamenge ist dagegen mit 3,6 ml/kg niedriger als es bei den „Versuchsfeld-Karpfen“ die Regel war. Zum Höhepunkt der Laichzeit (Mai bis Juli) wurden in den Spermproben ähnlich hohe Motilitätsraten wie in der vorliegenden Studie gefunden (87–90%), wobei die angegebenen Geschwindigkeitswerte für die VCL mit bis zu 200  $\mu\text{m/s}$  und die VSL mit bis zu 130  $\mu\text{m/s}$  ähnlich wie bei den Sterletspermien deutlich höher sind. Mit dem gleichen CASA-System hatten Toth et al. (1995) ähnliche Geschwindigkeitswerte bei Karpfenspermien gemessen. Perchec et al. (1995) mit Videomikrographie und anschließender manueller Bildanalyse sowie Perchec Poupard et al. (1998) mit einem CASA-System kamen ebenfalls zu ähnlichen VSL-Werten. Die Studie von Ravinder et al. (1997) analysierte die Motilität von Karpfenspermien mit zwei verschiedenen CASA-Systemen bei 25

und 60 Hz. Ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit wurden die Spermien nach Art ihrer Bewegungsbahn in Motilitätsklassen eingeteilt („linear“, „willkürlich“ und „kreisförmig“) und die Geschwindigkeiten danach aufgeschlüsselt. Alle Spermienklassen wiesen VCL- und VAP-Mittelwerte von 126–152  $\mu\text{m/s}$  bzw. 106–142  $\mu\text{m/s}$  auf und waren damit vergleichsweise höher. Die VSL war in den Klassen „kreisförmig“ und „willkürlich“ mit Mittelwerten von 31–39  $\mu\text{m/s}$  bzw. 49–70  $\mu\text{m/s}$  auf einem ähnlichen Niveau wie in der vorliegenden Arbeit für die Unterklassen der NLM (Nicht-Linear Motile) bzw. der LM (Linear Motile) ermittelt wurde. Da nicht genau angegeben wurde, nach welchen Kriterien die Klasseneinteilung vorgenommen wurde, sowie welcher Messzeitpunkt und welche Kammertiefe (10  $\mu\text{m}$  oder 130  $\mu\text{m}$ ) den Werten zugrunde liegt, können die Daten und Klassen nicht exakt verglichen werden. Höhere Geschwindigkeiten wurden auch in der CASA-Studie von Linhart et al. (2000) gemessen. Mögliche Gründe für diese Unterschiede werden im Abschnitt „Bewertung der Methoden“ (4.1.2.1 Videomikrographie) diskutiert.

Eine bessere Vergleichbarkeit gibt es mit der umfassenden Studie zur Kryokonservierung von Sperma diverser Cyprinidenarten von Lahnsteiner et al. (2000). Sie verwendeten ein nahezu identisches CASA-System (Stroemberg/Mika), wobei Messwerte von frischen Karpfenspermien zu den Parametern Anteil Motile (M: 79%), Lokal Motile (LoM: 8%), Linear Motile (LM: 75%), Nicht-linear Motile (NLM: 7%), Kreisläufer (KL: 18%) und zur VAP-Geschwindigkeit (119  $\mu\text{m/s}$ ) angegeben wurden. Unterschiede zur vorliegenden Arbeit ergeben sich dennoch aus den verschiedenen Messzeitpunkten (10 s gegenüber 20 s) und unterschiedlichen Systemeinstellungen. So wurden lokal motile Zellen als solche klassifiziert, wenn ihre VAP zwischen 5 und 20  $\mu\text{m/s}$  lag (hier: 10–30  $\mu\text{m}$ ). Der Anteil der Zellen der Klasse der Motilen vergrößert sich dadurch automatisch und auch die Werte der Unterklassen verschieben sich. Hinzu kommt, dass der maximale Bahnradius zur Klassifizierung von KL mit 20  $\mu\text{m}$  wesentlich größer war als hier (8  $\mu\text{m}$ ).

Die durchgeführten Versuche zu Einfluss der Messtemperaturen (10, 16 und 28°C) zeigte, dass, obwohl Karpfenspermien unter natürlichen Bedingungen erst bei ca. 20°C oder darüber ins Wasser entlassen werden, kältere Umgebungstemperaturen bessere Motilitätsleistungen (Motilitätsrate, Geschwindigkeit) hervorrufen. Höhere Temperaturen führen über die Erhöhung der Stoffwechselaktivität zu einer Verkürzung der Fortbewegungsdauer. Es wäre jedoch zu erwarten gewesen, dass bei höherer Temperatur zumindest zu Beginn der Motilitätsphase höhere Motilitätsraten und Geschwindigkeiten auftreten. Leider kann dies nicht diskutiert werden, da bei diesen Aufnahmen aus technischen Gründen die ersten Werte erst 30 s nach der Aktivierung analysiert werden konnten. Die gewonnenen Ergebnisse zur temperaturabhängigen Bewegungsdauer stehen im Einklang mit den Beobachtungen an Spermien der Meerbrasse *Acanthopagrus australis*, deren sehr lange Motilitätsdauer von über einer Stunde bei 4°C im

warmen Wasser (23°C) um mehr als die Hälfte reduziert war (Thorogood, J. & Blackshaw A., 1992). In diesem Zusammenhang sind auch die Ergebnisse von Perchec et al. (1995) zu nennen, die an Karpfenspermien nachwiesen, dass die Abnahme der Kopfschlagfrequenz als auch des ATP-Gehalts nach Aktivierung bei 2°C deutlich langsamer war als bei 20°C.

### *4.1.1.1.2 Immobilisierung*

In den Immobilisierungsversuchen konnte gezeigt werden, dass Karpfenspermien unter den getesteten Bedingungen über mehrere Stunden immobilisiert und anschließend ohne Qualitätsverlust aktiviert werden können. Dies ist die Hauptvoraussetzung für die Inkubation mit Testsubstanzen und für eine sensitive Prüfung ihrer Wirkungen auf Fischspermien.

Die in der Literatur beschriebene Regenerationsfähigkeit der Karpfenspermien in KCl-Lösungen (50–200 mM) bzw. in ionischen Lösungen von 300–400 mosM wurde nur zum Teil reproduziert. Zwar steigerte sich die Motilitätsrate der Spermproben mit anfänglich schwacher Motilität durch Inkubation in Immo1 (200 mM KCl) deutlich, jedoch wurde in keinem Fall eine vollständige Erholung auf 100% Motilität beobachtet, wie sie von Redondo-Müller et al. (1991) berichtet wurde. Allerdings war die Qualität der hier eingesetzten Spermien mit Motilitätsraten von etwa 10% vor der Regeneration vergleichsweise schlechter als in der zitierten Studie mit etwa 50%.

Ähnliche Beobachtungen dazu wurden auch von Toth et al. (1995) gemacht, die in ihrer CASA-Studie eine Regenerationsfähigkeit der Karpfenspermien in 200 mM KCl von bis 60% motilen Zellen ermittelten. Wie in der vorliegenden Arbeit erreichten sie mit kürzerer Inkubationszeit (2 h) bessere Werte als nach 4 h. Zusätzlich konnten sie zeigen, dass eine Inkubation der Spermien in natürlichem Seminalplasma vergleichsweise bessere Motilitätswerte liefert. Dies wurde von Christ et al. (1996) bestätigt, die mit beiden Inkubationsmedien zwar Motilitätswerte von bis zu 80% ermittelten, die Dauer der Vorwärtsbewegung war jedoch nach KCl-Inkubation wesentlich kürzer. Eine Verwendung von Seminalplasma zur Immobilisierung von Karpfenspermien wurde in der vorliegenden Arbeit aufgrund der komplexen und variierenden Zusammensetzung des Plasmas nicht in Erwägung gezogen.

Das Phänomen der „Aufladbarkeit“ von Karpfenspermien minderer Qualität muss im Hinblick auf eine Verwendung der Immobilisierungslösung als Inkubationsmedium noch genauer untersucht werden. Ebenso muss in diesem Zusammenhang der Aspekt der Regenerationsfähigkeit von Karpfenspermien geprüft werden, nach dem einmal motile Spermien nach Beendigung ihrer Motilitätsphase durch kurzzeitige Inkubation in KCl-Lösung erneut zur Bewegung stimuliert werden können (Perchec et al., 1995). Die Fähigkeit zur Reaktivierung bzw. ihre Beeinträchtigung unter dem Einfluss von Xenobiotika

könnte ein möglicher Endpunkt in einem Toxizitätstest sein. Außerdem muss geprüft werden, inwieweit sich kryokonservierte Spermien nach dem Auftauen regenerieren lassen. Im Verlauf der Arbeiten konnte kein solcher Effekt beobachtet werden. Neuere Untersuchungen, die zum Zeitpunkt der Kryokonservierungsversuche noch nicht vorgelegen haben, berichten jedoch von erfolgreicher Regeneration von aufgetauten Karpfenspermien (Linhart & Cosson, 1997).

### *4.1.1.1.3 Kryokonservierung und Befruchtung*

Die maximal erreichten Motilitätsraten von etwa 40% nach dem Auftauen liegen ca. 10 Prozentpunkte unter denen der Sterletspermien. Im Vergleich zu den Motilitätsraten der nativen Proben ist dies jedoch der durchschnittliche „Vorsprung“, den das Sterletsperma bereits vor dem Einfrieren hatte. Die vergleichsweise besten Ergebnisse wurden mit Kryo3 (15% DMA / 200 mM Sucrose), Kryo9 (15% DMA / 200 mM Trehalose) und Kryo10 (20% DMA / 200 mM Trehalose) erreicht. Der Kryoverdünner MK2 ist dabei Immo1 vorzuziehen. Das langsame Gefrierprofil II ist weniger geeignet als die Profile I und III, wobei letzteres wiederum etwas schneller ist als Profil I und ihm gegenüber leichte Vorteile zu haben scheint.

Im Vergleich zum Sterletsperma reagierten die Karpfenspermien gegenüber den angewendeten Kryomethoden sehr empfindlich. So wurde z.B. festgestellt, dass sich die Membraneigenschaften der Karpfenspermien durch den Einfrier- und Auftauprozess derart veränderten, dass sich die Zellen direkt nach dem Auftauen trotz Verdünnung in Immo1 bewegten, ohne dass es einer Aktivierung mit Initiatorlösung bedurfte. Um einen unnötigen Energieverlust zu verhindern, wurde daraufhin die Immobilisierungslösung so abgewandelt, dass sie einer Spontanbewegung der Spermien nach dem Auftauen entgegenwirkt. Dies wurde durch den Zusatz von Sucrose zu Immo1 (= ImmoS) erreicht. Außerdem wurden nur noch Kryomittel mit hohen Osmolalitäten eingesetzt. Die veränderten Zelleigenschaften wurden auch bei Vorversuchen zu den Befruchtungstests festgestellt. Nach dem Auftauen platzten viele Zellen, wenn sie mit höheren Verdünnungsraten, die für die Befruchtungsversuche notwendig waren, verdünnt wurden. Aus diesem Grund, aber vor allem weil Kalium in Konzentrationen von über 5 mM toxisch auf Karpfeneier wirkt (Saad & Billard, 1987), wurde eine weitere Immobilisierungslösung (ImmoF) erarbeitet. An Stelle von 200 mM KCl enthält sie 130 mM NaCl und wurde in den Befruchtungsversuchen erfolgreich eingesetzt (s.u.).

Die mit Kryo3, 9 und 10 erreichten Motilitätswerte nach dem Auftauen sind zwar relativ hoch, jedoch geringer als die Werte, die in einigen anderen Kryostudien mit Karpfenspermien ermittelt wurden. Vorweg zu unterscheiden sind dabei ältere Untersuchungen, in denen die Motilität noch subjektiv beurteilt wurde, von neueren Studien mit CASA- oder halbautomatischen Meßsystemen. In „subjektiven“

Studien wird von Motilitätsraten nach dem Auftauen von z.B. 50% (1:3 Verdünnung mit „Rana + 10% Methanol“: Leveroni Calvi et al., 1993), 49% bzw. 55% (1:9 mit „modified Kurokura’s Extender 2 + 10% DMSO“: Magyary et al., 1996a,b),  $46,7 \pm 3,3\%$  (1:3 mit „0,6 M Sucrose + 10% DMSO“: Babiak et al., 1997) und bis zu  $80 \pm 10\%$  nach zehnmütiger Inkubation der aufgetauten Spermien in 275 mM NaCl (1 + 1 mit „200 mM KCL + 10% Glycerin“: Linhart & Cosson, 1997) berichtet. Alle erwähnten internen Kryoprotektiva sowie ein Teil der geschilderten Methoden wurden während der vorliegenden Untersuchungen an den Spermien der Versuchsfeld-Karpfen getestet. Die angegebenen Motilitätsraten konnten unter den vorhandenen Bedingungen jedoch nicht reproduziert werden. Daraufhin wurde nach besseren Methoden bzw. Kryomitteln gesucht, wobei sich DMA, welches auch in der Studie von Babiak et al. geprüft wurde, als günstig erwies.

In zwei neueren CASA-Studien wurden Raten von  $51,5 \pm 6,7\%$  motilen +  $6,1 \pm 3,4\%$  lokal motilen Zellen (1:7 mit „BSMIS + 0,5% Glycin + 10% DMSO“: Lahnsteiner et al., 2000) und über 80% motilen Zellen (1:5 mit „Kurokura’s extender 1 + 10% DMSO“: Linhart et al., 2000) ermittelt. Diese neueren Methoden und Erkenntnisse konnten im Verlauf der hier beschriebenen Untersuchungen nicht nachgeprüft werden, da sie zum Zeitpunkt der Experimentierphase noch nicht vorlagen. Sie geben jedoch Hoffnung, dass die Motilitätsraten nach der Kryokonservierung weiter gesteigert werden können, was mit den hier beschriebenen Methoden zuletzt nicht gelang. Realistische, reproduzierbare Motilitätsraten liegen nach dem letzten Stand der vorliegenden Untersuchungen um 30%. Für den angestrebten Biotest sind jedoch Motilitätsraten wünschenswert, die auch nach mehrstündiger Inkubation der aufgetauten Spermien (im Kontrollansatz) über diesem Wert liegen.

DMSO ist wahrscheinlich das am meisten verwendete Kryoprotektivum für Fischspermien. Einigen Literaturangaben zufolge (s.o.) ist es auch für die Kryokonservierung von Karpfenspermien empfehlenswert. Wie bereits erwähnt, konnte das in den eigenen Studien nicht nachvollzogen werden. Mögliche Gründe hierfür können in geringfügigen, aber entscheidenden Abweichungen von den Protokollen liegen. Genau gleiche Bedingungen können bzw. konnten aus diversen Ursachen jedoch oft nicht erreicht werden. Diese Ursachen werden an späterer Stelle noch genauer diskutiert (s. 4.1.2.2 Kryokonservierung). Als Beispiel kann hier das jeweils verwendete Einfrierprofil genannt werden. Dies konnte z. T. aufgrund fehlender Ausstattung nicht reproduziert werden oder ist nur unzureichend im Quelltext beschrieben worden.

Der Vergleich der anderen nach dem Auftauen gemessenen Motilitätseigenschaften wie Geschwindigkeit, Linearität und laterale Kopfauslenkung mit den Angaben aus den beiden CASA-Studien ist nur begrenzt möglich. Zwar verwendeten Lahnsteiner et al. (2000) ein nahezu identisches CASA-System (Stroemberg/Mika), jedoch gaben sie lediglich Werte zu den Parametern Motilitätsrate (s.o.), VAP (70  $\mu\text{m/s}$ ), Linear Motile (LM: 80%), Nicht-linear Motile (NLM: 6%) und Kreisläufer (KL:

13%) an. Wie bereits für die frischen Spermien erwähnt wichen ihre Systemeinstellungen von den hier angewendeten ab. Berücksichtigt man den Zeitpunkt der Messwertnahme (10 s gegenüber 20 s), dann ist die VAP mit ca. 70  $\mu\text{m/s}$  gegenüber ca. 60  $\mu\text{m/s}$  auf dem gleichen Niveau. Der Prozentsatz der LM ist in der vorliegenden Arbeit etwa 10–20 Prozentpunkte niedriger, der Wert für die NLM allerdings etwa 30% höher. Dafür fällt bei den hier aufgetauten Karpfenspermien die Unterklasse der KL ganz weg. Ohne Angabe über die Geschwindigkeitsklasse (VCL, VAP oder VSL) berichteten Linhart et al. (2000) in ihrer CASA-Studie von aufgetauten Karpfenspermien, die 15 s nach Aktivierung  $94\pm 28 \mu\text{m/s}$  schnell waren.

Die Ergebnisse aus den vorliegenden Befruchtungsversuchen waren besonders im Hinblick auf die Schlupfraten und den Anteil an schwimmfähigen Larven sehr erfolgreich. So konnten Spermien, die für 6 Tage mit Kryo10 konserviert waren, ebenso hohe Schlupfraten (80%) wie im Kontrollansatz erzielen. Fast ein Jahr lang in Kryo3 konservierte Zellen produzierten immerhin noch fast 40% an schwimmfähigen Larven mit normaler Embryonalentwicklung. Es lässt sich allerdings nicht klären, ob dieser signifikant schlechtere Wert auf das Kryomittel oder auf die längere Einfrierdauer zurückzuführen ist. Obwohl in der Regel davon ausgegangen wird, dass Alterungsprozesse in flüssigem Stickstoff bei  $-196^\circ\text{C}$  auf ein Minimum reduziert sind, wurde im Verlauf des Projekts mehrfach beobachtet, dass die Qualität des eingefrorenen Spermias mit zunehmender Lagerungszeit merklich schlechter wurde. Es kann jedoch auch nicht mit Sicherheit behauptet werden, dass die Kryobedingungen für alle Proben konstant waren und/oder dass es zu mehr oder weniger starken Erwärmungen während der Lagerung gekommen ist. Unregelmäßigkeiten in der Lagerungstemperatur (Auffüllen der Stickstoffbehälter) sind aufgrund des langen Zeitraums der Untersuchungen und der nicht-gegebenen permanenten Kontrolle möglich.

Die fünfminütige Equilibrierung mit dem Kryomittel (20% DMA) führte zu einer signifikanten Abnahme der Motilität, jedoch lediglich zu einer leichten Abnahme der Schlupfrate. Möglicherweise wirkt DMA auf die Karpfeneier weniger toxisch als auf die Spermien. Diese Annahme würde auch erklären, warum in den vorliegenden Befruchtungsversuchen trotz relativ niedriger Motilitätsraten höhere Befruchtungs- und Schlupfraten bzw. Prozentzahlen an schwimmfähigen Larven erreicht wurden, als bisher für Versuche mit kryokonservierten Karpfenspermien in der Literatur angegeben wurde. Einzig Magyary et al. (1996b) erreichten ähnlich hohe Werte für Befruchtung und Schlupf. In anderen Studien, in denen DMSO zur Kryokonservierung von Karpfensperma eingesetzt wurde, und die nach dem Auftauen höhere Motilitätsraten als hier erzielten, wurde entweder eine geringere Befruchtungsrate gemessen und/oder die Embryonalentwicklung verlief nicht so positiv wie in den vorliegenden Versuchen (Babiak et al., 1997; Linhart et al., 2000). Dass Babiak et al. in ihrer Studie mit DMA-konservierten Karpfenspermien wesentlich bessere Prozentzahlen an schwimmfähigen Larven erhielten (70% gegenüber 5% in den

DMSO-Versuchen), unterstreicht diese Annahme. Nach dreiminütiger Equilibrierung von Spermien der Mairénke (*Chalcalburnus chalcoides*) mit diversen Kryoprotektiva und anschließender Bestimmung der Motilität stuften Lahnsteiner et al. (2000) bereits 5% DMA als toxisch ein, nicht jedoch 15% DMSO. Dass DMSO auf der anderen Seite relativ toxisch auf Karpfeneier und -embryos wirkt, wurde in zwei anderen Studien demonstriert (Suzuki et al., 1995; Ahammad et al., 1998).

### **4.1.1.2 Sterlet**

Unter geeigneten Umwelt-, Zucht- und Hälterungsbedingungen können von Sterlets einmal jährlich ausreichende Spermamengen von guter Qualität gewonnen werden. Diese Bedingungen können jedoch nur von Teichwirtschaftsbetrieben mit langjähriger Erfahrung im Umgang mit Stören erfüllt werden. Da Störe auch unter optimalen Bedingungen erst nach einigen Jahren geschlechtsreif werden, gibt es in Deutschland nur wenige Betriebe, die in der Lage sind, Störe bis zur Laichreife zu führen. Neben den Schwierigkeiten bei der Aufzucht von Fischen durch Krankheiten und Parasiten, ist die Gewöhnung der Störe an vorgefertigtes Trockenfutter (Pellets) relativ schwierig. Die Aufzucht der Jungfische erfolgt mit relativ teurem Lebendfutter (z.B. Tubifex, Chironomidenlarven). Eine Umstellung der Fische kann nur innerhalb der ersten Lebenswochen erfolgen und ist oft mit dem Verlust von Tieren verbunden. Eine spätere Umgewöhnung auf günstiges Trockenfutter ist nur schwer möglich.

Unter den angesprochenen kontrollierten Bedingungen sind beim Sterletsperma Qualitätsschwankungen von Saison zu Saison offensichtlich relativ gering. Schwankungen sind lediglich zwischen den Individuen der Population zu erwarten. Von hormonell stimulierten Tieren können etwa 5–10 ml Sperma von guter bis sehr guter Qualität je kg Körpergewicht abgenommen werden. Sterletsperma dieser Qualität vereint fast alle gewünschten Eigenschaften (vgl. 1.1.4 Anforderungen an geeignetes Fischsperma) auf sich.

#### **4.1.1.2.1 Motilität**

Anfängliche Motilitätsraten liegen überwiegend zwischen 70 und fast 100%. Dies ist eine wesentliche Voraussetzung, um auch nach der Kryokonservierung hohe Motilitätsraten zu erreichen. Die Motilitätsphasen sind mit maximal fünf bis zehn Minuten die mit Abstand längsten im Vergleich zu den anderen untersuchten Arten. Diese langen Phasen sind vor allem dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Zusatz zum Verdüner (IniCa) zuzuschreiben. IniCa bewirkt außerdem eine Erhöhung der Spermigeschwindigkeit und vergrößert die laterale Kopfauslenkung.

In der Fachliteratur sind nur sehr wenige Vergleichsdaten zu Störspermien im Allgemeinen und noch weniger zu Sterletspermien im Speziellen zu finden. Eine Arbeit von Tsvetkova et al. (1996), die sich als einzige ebenfalls mit der Motilität, Kryokonservierbarkeit und Befruchtungsfähigkeit von *A. ruthenus* - Spermatozoen beschäftigt hat, gibt die anfänglichen Werte für die Motilitätsrate der frischen Zellen mit  $68 \pm 19\%$  ( $n = 5$ ), die Dauer der aktiven Vorwärtsbewegung mit 2–3 min und die Geschwindigkeit mit 100–300  $\mu\text{m/s}$  an. Letztere liegt deutlich über den hier ermittelten Werten, ist aber mit einer anderen Methode und direkt nach dem Auslösen der Bewegung gemessen worden. Die Autoren geben zusätzlich an, dass 40–60 s nach der Initiation ein starker Abfall der Geschwindigkeit gemessen wurde. Die kürzere gemessene Bewegungsdauer ist wahrscheinlich auf den fehlenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Einsatz zurückzuführen.

Für die Spermien des Sibirischen Störs (*Acipenser baerii*) geben die Autoren in derselben Publikation eine im Vergleich zum Sterlet etwas höhere Motilitätsrate ( $88 \pm 4,4\%$ ;  $n = 5$ ) sowie eine etwas längere Bewegungsdauer (3–4 min) an. Andere Arbeiten mit dieser Störart kamen zu ähnlichen Ergebnissen (Gallis et al., 1991; Billard et al., 1999).

CASA-Studien an Spermien vom Seestör (*Acipenser fulvescens*) ergaben Motilitätsphasen von mehr als 5 min und anfängliche Geschwindigkeiten von mehr als 300  $\mu\text{m/s}$  (VCL) bzw. 100  $\mu\text{m/s}$  (VSL) (Ciereszko et al., 1996; Toth et al., 1997). Die ermittelte Linearität (VSL/VCL) war durch diesen großen Unterschied mit 30–40% deutlich geringer als die in der vorliegenden Arbeit ermittelte. Die angegebene Amplitude für die Kopfauslenkung liegt mit 4–5  $\mu\text{m}$  um etwa doppelt so hoch wie für die hier mit Sterletspermien ermittelten und kann durch den kürzeren Kopf der Sterletspermien erklärt werden.

Dass die Motilitätseigenschaften stark durch das Verdünnungsmedium beeinflusst werden können, zeigten auch die Arbeiten mit Spermien von Stören anderer Familien bzw. Unterfamilien wie dem Löffelstör (*Polyodon spathula*) und dem Gemeinen Schaufelstör (*Scaphirhynchus platyrhynchus*) (Linhart et al., 1995; Cosson et al., 2000). Durch die Wahl des geeigneten Mediums konnte die Bewegungsdauer der Löffelstör-Spermien von 4–6 min auf bis zu 9 min gesteigert werden. Die Geschwindigkeit erhöhte sich ebenfalls auf über 250  $\mu\text{m/s}$  (siehe auch Methodendiskussion: 4.1.2.1 Videomikrographie).

#### 4.1.1.2.2 Lagerung und Immobilisierung

Ein Vorteil des Sterletspermas ist die lange Lagerungsfähigkeit. Wird das Sperma kühl und dunkel gelagert, kann es in der Regel ein bis zwei Tage lang ohne größeren Qualitätsverlust aufbewahrt werden. DiLauro et al. (1994) berichteten von erfolgreicher fünftägiger Konservierung von Spermproben des Atlantischen Störs (*Acipenser oxyrhynchus oxyrhynchus*) durch tägliche Begasung mit Sauerstoff. Durch



den Zusatz von Antibiotika kann sogar eine Verlängerung der Lagerungsdauer auf mehrere Wochen erreicht werden, wie eine Arbeit von Brown & Mims (1995) mit Löffelstör-Sperma zeigte.

Ähnlich gut wie die Lagerungsfähigkeit ist die Immobilisierungsfähigkeit der Sterletspermien. Nach bis zu 20-stündiger Immobilisierung von frischen Spermien in ImmoA konnte eine Aktivität ausgelöst werden, die nicht schlechter war als zu Beginn der Versuche. Auch Inkubationen mit ImmoA bei Raumtemperatur waren mit frischen Spermien über mehrere Stunden möglich. Diese Ergebnisse sind eine wichtige Voraussetzung für die Inkubation der Spermien mit Chemikalien. Je länger die Kontaktzeiten gewählt werden können, umso geringere Effektkonzentrationen sind bis zur Gleichgewichtseinstellung zu erwarten.

Auch kryokonservierte Sterletspermien ließen sich einige Zeit immobilisieren, ohne dass die Aktivität im Vergleich zum Beginn der Versuche schlechter war. Allerdings war die Anzahl der motilen Zellen mit Werten um 10% so gering, dass unter Berücksichtigung der Chemikalienwirkung und der zu erwartenden Variabilität ein Einsatz der so behandelten Spermien in einem Biotest mit dem Endpunkt Motilität wenig sinnvoll erschienen.

### *4.1.1.2.3 Equilibrierung und Kryokonservierung*

Bereits nach kurzer Equilibrierung (5 min) der nativen Sterletspermien mit Ethylenglycol (EG) reduzierte sich der Anteil motiler Zellen im Vergleich zur Kontrolle deutlich. Endkonzentrationen zwischen 15 und 20% EG sind noch höheren vorzuziehen. Mit Zunahme der Equilibrierdauer nahm der Grad der Reduktion zu. Dennoch ist die toxische Wirkung des EG auf die Spermienmotilität als vergleichsweise gering zu betrachten, da die Abnahme der Motilitätsrate nach 20-minütiger Equilibrierung trotz der relativ hohen Konzentration von 17,5% EG nur etwa 20 Prozentpunkte betrug. Im Vergleich dazu wurde die Motilität der Karpfenspermien in den Befruchtungsversuchen durch Kryo10 (20% DMA, Endkonzentration ca. 16,7%) schon innerhalb von 5 min um 35 Prozentpunkte reduziert (vgl. Tabelle 12, S. 78). In der Literatur sind zwar keine Angaben zur Equilibrierung von Kryomitteln mit Störsperma zu finden, dafür wird jedoch für eine Reihe anderer Arten eine toxische Wirkung der eingesetzten Kryomittel während der Equilibrierung belegt. Geeignete Kryomittel sowie optimale Equilibrierzeiten sind dabei abhängig von der Fischart. In den meisten Fällen wird die Equilibrierzeit möglichst kurz gewählt, um die toxischen Wirkungen der Kryomittel zu minimieren (Moczarski, 1977; Lubzens et al., 1997). In manchen Fällen dauert es länger bis sich ein optimales Gleichgewicht eingestellt hat (Gwo et al., 1991; Horvath & Urbanyi, 2000). Dies scheint vor allem für den Einsatz von DMSO als Kryoprotektivum zu gelten.

Beste Totale Motilitätswerte nach dem Auftauen wurden bei Endkonzentrationen von 15% ( $43,1 \pm 3,4\%$ ) und 20% EG ( $45,1 \pm 5,2\%$ ) erzielt. Höhere Konzentrationen ergaben signifikant schlechtere Ergebnisse. Beim Einfrieren war Gefrierprofil I dem langsameren Profil II vorzuziehen. Der Zusatz von Zucker in der Form von Sucrose in Endkonzentrationen zwischen 5 und 150 mM hatte in Kombination mit 15% EG und Profil I keinen großen Einfluss auf die Motilität nach dem Auftauen. Die besten Ergebnisse wurden hierbei in den Versuchen mit 50 mM Sucrose erreicht, die auch unter Berücksichtigung der Parallelversuche mit Profil III die höchsten Motilitätsraten ergaben. Mit diesem noch schnelleren Gefrierprofil waren schon geringe Sucrose-Zusätze von 5 mM förderlich, um die Motilitätswerte im Vergleich zur Kontrolle zu steigern. Höhere Zusätze ab 50 mM Sucrose führten hingegen zu einem Abfall der Motilität. Offenbar ist der Sucrose-Zusatz besonders bei schnelleren Einfriergeschwindigkeiten ( $> 6^\circ\text{C}/\text{min}$ ) kryoprotektiv wirksam.

Die Motilitätsdauer der aufgetauten Sterletspermien verkürzte sich im Vergleich zur nativen Probe um einige Minuten, erreichte aber in der Regel wenigstens drei, meistens sogar fünf Minuten. Dieser Zeitraum erscheint lang genug, um in dem angestrebten Toxizitätstest neben einer eventuellen Reduzierung der Motilitätsrate auch eine mögliche Verkürzung der Bewegungsdauer zu bewerten.

Im Verlauf der Untersuchungen waren eine Reihe von Kryoprotektiva (z.B. DMSO, DMA, Glycerin, Methanol, Propandiol) und Zusätzen (z.B. Rinderserumalbumin (RSA), Hühnereidotter, Ovarialflüssigkeit (OV)) in verschiedensten Konzentrationen und unter unterschiedlichen Bedingungen (z.B. Equilibrierung, Einfrier- und Auftauprofile) getestet worden. Keine dieser Varianten erreichte die oben für Ethylenglycol angegebenen Ergebnisse. Dennoch ist nicht auszuschließen, dass mit einer geeigneten Kombination aus den genannten Einzelkomponenten die Kryoergebnisse verbessert werden könnten. Wie durch die letzten Versuche zum Sucrose-Zusatz deutlich wird, beeinflussen viele Parameter den Erfolg der Kryokonservierung.

Der Vergleich mit den wenigen vorliegenden Publikationen zur Kryokonservierung von Störsperma zeigt, dass die erreichten Ergebnisse auf einem sehr guten Niveau liegen. Zwei Arbeiten berichten zwar von Motilitätsraten nach dem Auftauen von bis zu 90%, wobei eine Kryolösung bestehend aus DMSO, Eidotter und Tris-HCl benutzt wurde (Cherepanov et al., 1993; Drokin et al., 1993). Diese Ergebnisse sind jedoch aufgrund fehlender Angaben, vor allem zur Motilitäts-Bewertungsmethode, zu relativieren. Bei Kryoversuchen mit Sperma vom Sterlet (*A. ruthenus*) und vom Sibirischen Stör (*A. baerii*) erreichten Tsvetkova et al. (1996) nach der Kryokonservierung Motilitätsraten von  $15 \pm 11\%$  bzw.  $23 \pm 8\%$ . Als Kryomittel verwendeten sie ebenfalls eine Lösung aus DMSO, Eidotter und Tris-HCl, welcher - ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit - Sucrose als externes Kryoprotektivum zugesetzt wurde.

Gute Vergleichsmöglichkeiten ergeben sich mit einer Studie zu Seestör-Spermien von Ciereszko et al. (1996), die für die Bewertung der Motilität ebenfalls eine computerunterstützte Bewegungsanalyse (CASA) verwendeten. Die besten Proben erreichten Motilitätswerte von  $19,2 \pm 10,0\%$  nach dem Auftauen. Allerdings waren die Voraussetzungen für die Kryokonservierung mit Motilitätsmittelwerten von ca. 46% für die frischen Spermien nicht optimal. Die Autoren verwendeten ein Kryomittel bestehend aus 10% DMSO und 0,6 M Sucrose, welches ursprünglich für Forellensperma eingesetzt wurde (Holtz, 1993). Die angegebene VCL war mit über  $300 \mu\text{m/s}$  zu den Zeitpunkten „0“ und „5“ min ähnlich hoch wie die der nativen Spermien (s.o.), und die VSL zeigte zum Zeitpunkt „0“ min ebenfalls keine signifikante Abnahme im Vergleich zu den Werten vor dem Einfrieren. Sie lag mit etwa  $90 \mu\text{m/s}$  um  $20 \mu\text{m/s}$  über der in der vorliegenden Arbeit für aufgetaute Sterletspermien ermittelten. Wie bereits für natives Sterletsperma erwähnt, ist aufgrund der großen Unterschiede zwischen VCL und VSL der Parameter Linearität der aufgetauten Seestör-Spermien mit Werten um 30% vergleichsweise gering (vorliegende Arbeit: um 80%). Die Werte für die laterale Kopfauslenkung (LHD) wurden durch den Einfrier- und Auftauprozess ebenfalls nicht beeinträchtigt und lagen mit Werten von ca.  $5 \mu\text{m}$  um ein mehrfaches höher als in der vorliegenden Arbeit für die aufgetauten Sterletspermien ermittelt wurde (ca.  $1,5\text{--}2 \mu\text{m}$ ).

#### 4.1.1.2.4 Fertilität

In den Befruchtungsversuchen konnte gezeigt werden, dass sowohl die nativen als auch die nach den beschriebenen Methoden kryokonservierten Sterletspermien in der Lage sind, erfolgreich zu befruchten und normale Embryonen zu produzieren. Die Befruchtungs- und Schlupfrate ist mit Werten von mindestens 70% als sehr gut zu bewerten. Da in dem Ansatz mit kryomittel-equilibrierten Spermien keine wesentlich höheren Befruchtungsraten und sehr ähnliche Entwicklungszahlen ermittelt wurden, ist anzunehmen, dass lediglich der Kontakt der Spermien und/oder der Eier mit dem Ethylenglycol und nicht der Einfrier- und Auftauprozess für die Verminderung des Befruchtungserfolgs im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle verantwortlich ist. Besonders bemerkenswert ist, dass die Reduzierung der Spermienzahl je Ei um den Faktor 1000 auf  $1 \cdot 10^3/1$  keinen messbaren Unterschied in der Befruchtungsrates bewirkte. Dabei wird deutlich, dass ein direkter Zusammenhang zwischen Motilität und Fertilität auf diesem Wege nicht ohne weiteres nachzuweisen ist. Eine positive Korrelation ist wahrscheinlich erst bei noch kleineren Spermien/Ei-Verhältnissen zu finden, wobei berücksichtigt werden muss, dass mit kryokonservierten Zellen wiederum andere Verhältnisse zu erwarten sind.

Vergleichsdaten zur Befruchtungsfähigkeit von kryokonservierten Störspermien gibt es nur aus der Studie von Tsvetkova et al. (1996). Die berichteten Befruchtungsraten von  $53 \pm 8\%$  beim Sibirischen Stör

(Kontrolle:  $89\pm 8\%$ ) und  $23\pm 11\%$  beim Sterlet (Kontrolle:  $53\pm 9\%$ ) reichen nicht an die vorliegenden Werte heran.

#### **4.1.1.3 Andere Arten**

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, wurden auch Spermaproben einiger anderer Fischarten für die Eignung in einem Toxizitätstest untersucht. Dabei wurden in erster Linie die Motilitätseigenschaften vor und z.T. auch nach dem Einfrieren/Auftauen als Kriterium herangezogen. Flussbarsch (*P. fluviatilis*), Güster (*B. bjoerkna*), Sibirischer Stör (*A. baerii*) und Regenbogenforelle (*O. mykiss*) erwiesen sich schnell aus diversen Gründen als ungeeignet. Umfangreichere Untersuchungen wurden mit Spermaproben vom Steinbutt (*S. maximus*) und Hering (*C. harengus*) vorgenommen. Proben vom Dorsch (*G. morhua*), der Kleinen Maräne (*C. albula*) und der Tilapiaart *O. niloticus* wurden ebenfalls untersucht.

Mit Steinbuttsperma konnten die in der Literatur angegebenen Werte zu den Charakteristika Motilitätsrate, Spermavolumen, Zellkonzentration und anderen Spermaeigenschaften zum größten Teil reproduziert werden (Geffen und Frayer, 1993; Suquet et al., 1994, Suquet et al., 1995). Die Motilitätsdauer erreichte jedoch nur in wenigen Fällen Werte von über drei Minuten. Lange Motilitätsphasen konnten im zweiten Untersuchungsjahr nur durch den Zusatz von Rinderserumalbumin (RSA) erreicht werden, wie bereits von Suquet et al. (1995) beschrieben. Die Steinbuttspermien ließen sich zwar relativ gut kryokonservieren, wie dies auch in der Literatur beschrieben ist (Dreanno, C. et al., 1997; Chereguini, O. et al., 1997), dennoch sprechen einige Punkte gegen eine Verwendung in einem Toxizitätstest:

- a) Die abzustreifende Spermamenge war relativ gering. Um für die Kryokonservierung ausreichende Mengen zu gewinnen, müsste eine große Anzahl der vergleichsweise schlecht verfügbaren, laichreifen Tiere abgestreift werden.
- b) Die Spermaqualität unterlag großen saisonalen und individuellen Schwankungen.
- c) Im Seminalplasma der meisten gewonnenen Proben wurden neben den Spermazellen größere und kleinere Partikel gefunden. Diese störten bei der CASA-Auswertung der Motilität.
- d) Die Immobilisierung von Steinbuttspermien war nicht so einfach durchzuführen wie z.B. bei Sterletsperma. Die gemessene Motilitätsdauer war nicht so lang, dass auf eine Immobilisierung für Toxizitätstests verzichtet werden könnte.

Die in der Literatur beschriebenen Eigenschaften der Spermien vom Pazifischen Hering wären eine ideale Voraussetzung für die Durchführung eines Fertilitätstests. Jedoch liegen die Verhältnisse beim untersuchten Baltischen Hering offenbar anders als bei der pazifischen Art. Eine reproduzierbare Aktivierung der Spermien und Messung der Motilität war trotz intensiver Bemühungen nicht möglich. Gründe hierfür konnten nicht abschließend geklärt werden. Ein geeigneter Verdünner wurde nicht gefunden. Offenbar spielen außer der Verdünnung im Meerwasser auch andere Faktoren bei der Aktivierung eine Rolle.

Die wenigen Informationen, die zu Dorsch sperma gewonnen werden konnten, reichen nicht aus, um die Eignung dieser Fischart abschließend zu bewerten. Es war bei dieser Art sehr schwierig, an ausreichende Spermamengen von guter Qualität zu gelangen. Die Geschwindigkeitswerte (VAP) der gemessenen Proben mit aktiven Spermien lagen deutlich über den von Trippel und Neilson (1992) berichteten. Die in der Literatur angegebenen Motilitätsphasen von bis zu 16 min (Westin und Nissling, 1991) konnten zwar in einem Fall bestätigt werden, jedoch bestehen starke Zweifel, ob diese lange Phase von allen gemessenen, motilen Spermien aufrecht erhalten wurde. Außer der Motilitätsbewertung von nativen Proben müsste bei Dorsch sperma geklärt werden, inwieweit es immobilisier- und kryokonservierbar ist.

Bei den beiden anderen Arten (Kleine Maräne und Tilapia) liegen wie beim Dorsch keine Ergebnisse zur Kryokonservierung vor. Außerdem waren die gewonnenen Spermamengen so gering, dass auf Kryokonservierungsversuche verzichtet wurde. Das geringe Spermavolumen spricht neben den beobachteten ungenügenden Motilitätseigenschaften gegen eine Verwendung dieser Arten.

Trotzdem sollte die Suche nach möglicherweise (besser) geeigneten Fischarten als Spermadonatoren für einen Toxizitätstest nicht aus den Augen verloren werden. Die eingangs erwähnten Voraussetzungen sollten jedoch in jedem Fall erfüllt sein (vgl. 1.1.4 Anforderungen an geeignetes Fischsperma). Seit einiger Zeit werden Spermien vom Afrikanischen Kiemensackwels (*C. gariepinus*) in ökotoxikologischen Studien eingesetzt (Kime et al., 1996; Rurangwa et al., 2002). Wie an späterer Stelle noch diskutiert wird, gibt es Hinweise auf substanzabhängige Sensitivitätsunterschiede im Vergleich zu Karpfenspermien.

### **4.1.2 Bewertung der Methoden**

#### **4.1.2.1 Videomikrographie**

Die Beurteilung der Motilität von Fischspermazellen mit Hilfe der computergestützten Videomikrographie (CASA) stellt eine schnelle und vor allem objektive Alternative zu den herkömmlichen Methoden mit manueller Bildauswertung dar. Innerhalb kurzer Zeit kann eine Vielzahl

von Spermaproben untersucht und zu jeder Spermaprobe eine große Datenmenge von zuverlässiger Qualität gewonnen werden. Außerdem ist die zeitliche Unabhängigkeit der Auswertung der Spermienmotilität durch die Videoaufnahme ein großer Vorteil und macht die Arbeitsvorgänge flexibel und schnell. Die routinemäßige Durchführung aller Arbeitsschritte ist mit etwas Übung leicht von einer Person zu bewerkstelligen.

Ein Nachteil der CASA war sicherlich der relativ hohe Anschaffungspreis zu Beginn der Marktreife. Inklusiv Mikroskop, Videoanlage und PC mit entsprechender Hard- und Software mussten Mitte der 1990er Jahre noch ca. 80.000 DM bezahlt werden. Mittlerweile ist die Hardware relativ günstig geworden, so dass lediglich die Software ins Gewicht fällt. Trotz fortschreitender Entwicklung und Digitalisierung der Bildauswertung kann der Preis für die Software je nach Ausstattung und Hersteller zwischen 2.000 und 20.000 Euro liegen.

Trotz der objektiven Analyse der Motilität kommen häufig relativ große Werteschwankungen vor. Bei Wiederholungsmessungen können die Werte aus einer frischen Probe um bis zu 30% auseinander liegen. Bei kryokonservierten oder behandelten Proben ergeben sich manchmal noch größere Variabilitäten. Technisch/methodische Ursachen für die Abweichungen können zum einen beim Bearbeiter der Probe (z.B. Sauberkeit beim Pipettieren), zum anderen an einer unsaubereren oder ungenauen (zerkratzen) Messkammer liegen. Der Hauptgrund ist jedoch meistens weniger in der Methode, als vielmehr in den Qualitätsschwankungen des biologischen Materials zu suchen. Sogar innerhalb einer Probe kann es zu Inhomogenitäten in der Spermienqualität kommen. Diese Inhomogenität kann durch Mischung von reifen und unreifen Spermazellen, durch Teilkontamination z.B. mit Urin oder durch zu lange sauerstoffarme Lagerung auftreten. Dass eine gleichmäßige Versorgung der Proben während der Lagerung mit Sauerstoff für die Motilität vor und nach dem Einfrieren von Vorteil ist, zeigten z.B. Magyary et al. (1996a) an Karpfensperma. Zusätzlich unterliegen aufgetaute, equilibrierte oder anders behandelte Proben einem schnelleren Alterungsprozess als native Proben. Innerhalb weniger Minuten kann sich die Qualität der aufbewahrten Proben und damit der jeweilige Messwert ändern.

Beim Vergleich der in der vorliegenden Arbeit ermittelten Daten mit Literaturwerten traten z.T. Unterschiede auf, die über das Maß der natürlichen Schwankungen hinausgehen. Besonders beim Parameter VCL-Geschwindigkeit, aber auch bei den anderen Geschwindigkeitsklassen (VAP, VSL), lagen die hier gemessenen Werte für Karpfen- und Sterletspermien in der Regel deutlich unter den bisher publizierten. Als mögliche Ursachen kommen folgende Punkte in Betracht: a) Wahl unterschiedlicher Methoden bei der Spermienaktivierung (Verdünnungsmedium, Verdünnungsrate), b) Messwertnahme zu einem anderen Zeitpunkt, c) Verwendung anderer Messkammern, d) Ermittlung anderer Daten aufgrund eines anderen CASA-Systems (Aufnahmefrequenz, Hard- und Software).

zu a) Wahl unterschiedlicher Methoden bei der Spermienaktivierung:

Nach Billard & Cosson (1992) ist aufgrund der hohen Viskosität eine relativ hohe Verdünnungsrate von Sperma:Verdüner von (mindestens) 1:1000 notwendig, um alle Spermien gleichzeitig zu aktivieren. Andernfalls werden die Spermien nur verzögert aktiviert und man analysiert im Verlauf der Motilitätsphase jedes Mal eine andere Spermienfraktion. Dieses Phänomen wurde in den vorliegenden Untersuchungen bei Karpfen- und Sterletspermien nicht beobachtet, obwohl diese in wesentlich geringeren Verdünnungsraten aktiviert wurden (Karpfen: 1:100 (1:10 + 1:10); Sterlet: 1:5 (1:2 + 1:2,5)). Es trat aber bei einigen anderen untersuchten Arten auf. Die Gefahr einer verzögerten Aktivierung besteht vor allem dann, wenn Spermien und Initiatorlösung erst in der Messkammer gemischt werden, und nicht schon vorher, wie es hier in kleinen Reaktionsgefäßen (1,5–2 ml) gründlich vorgenommen wurde. Aus diesem Grund haben Billard & Cosson auch die zweistufige Methode, bestehend aus einer Vorverdünnung in einem Reaktionsgefäß und der Hauptverdünnung auf dem Mikroskopisch, vorgeschlagen. Das Verdünnungsverhältnis im zweiten Schritt kann jedoch nur dann exakt eingehalten werden, wenn das pipettierte Volumen mit dem Volumen der Messkammer genau übereinstimmt. Aufgrund des geringen Fassungsvermögens der vorhandenen Messkammern und der Schwierigkeiten, die Kammern schnell zu schließen, wurde auf eine Aktivierung auf dem Mikroskopisch verzichtet. Auswirkungen auf die präsentierten Messergebnisse aufgrund der Verdünnungsmethode werden jedoch ausgeschlossen.

Mögliche Unterschiede in den Messwerten können jedoch auch durch die Zusammensetzung der Aktivierungslösungen entstanden sein. Aus den beschriebenen Gründen wurde den Initiatorlösungen für Sterlet- und Karpfenspermien jeweils 10 mM  $\text{CaCl}_2$  zugesetzt. Obwohl schon lange bekannt ist, dass  $\text{Ca}^{2+}$ -Zusätze die Motilitätsdauer verlängern, sind aus der Literatur bisher keine  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen Verdüner für das Sperma dieser beiden Fischarten bekannt. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, kommt dem  $\text{Ca}^{2+}$  eine entscheidende Rolle beim Auslösen der Motilität zu. Bei Forellenspermien konnte gezeigt werden, dass eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Zugabe zwar die Motilität verlängert, die Neu-Synthese von ATP nach Beendigung der Motilitätsphase jedoch unterdrückt wird (Christen et al., 1987). Ist nicht genügend  $\text{Ca}^{2+}$  im Medium vorhanden ( $< 10^{-6}$  mM) ist die Initiation der Motilität komplett gehemmt. Hohe  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen können die von  $\text{K}^+$ -verantwortete Hemmung der Motilität wiederum überlagern (Billard & Cosson, 1992).

zu b) Messwertnahme zu einem anderen Zeitpunkt:

Aus technischen Gründen wurden in der vorliegenden Dissertation Motilitätswerte frühestens nach 15 s ermittelt. Die meisten hohen VCL-Werte aus den anderen Publikationen stammen aus den ersten Sekunden nach der Aktivierung, in denen offenbar sehr hohe Geschwindigkeiten von über 300  $\mu\text{m/s}$  auftreten können. Die Geschwindigkeit sinkt dann innerhalb kurzer Zeit rasch ab. Da in der Publikation

von Ciereszko et al. (1996) zu Seestörsperma auch die Werte zum Zeitpunkt 5 min angegeben sind und die VCL-Werte dort auch über 300  $\mu\text{m/s}$  liegen, kann der Zeitpunkt der Messung (hier) jedoch nicht als Ursache für den großen Unterschied zu den Sterletspermien (VCL ca. 70  $\mu\text{m/s}$  nach 5 min) in Frage kommen.

zu c) Verwendung anderer Messkammern:

Auf die Abhängigkeit der Videomikrographie-Messwerte von der Wahl des Messkammertyps wurde u.a. von Nehring et al. (1994) hingewiesen. Sie verglichen die Motilitätswerte von gefrierkonservierten Bullenspermien in verschiedenen Kammertypen (*Makler*, *Mika*, *Thoma* und einfache Objektträger) miteinander und zeigten, dass trotz gleicher Kammertiefe (10  $\mu\text{m}$ ) in der Makler-Kammer höhere Motilitätsraten und größere Geschwindigkeiten erreicht werden als z.B. in der hier verwendeten Mika-Kammer. Die Differenzen in den Mittelwerten zwischen den vier Kammertypen betragen 4–18 Prozentpunkte bei der Motilitätsrate und 15–49  $\mu\text{m/s}$  bei der Geschwindigkeit. Die Varianz der Messwerte hängt den Autoren zufolge ebenfalls von der Wahl der Messkammer, ihrer Tiefe und der Anzahl der Wiederholungsmessungen ab. Andererseits fanden Ravinder et al. (1997) keine Unterschiede in den Motilitätsmustern („linear“, „willkürlich“ oder „kreisförmig“) von Karpfenspermien, die in einer 10- $\mu\text{m}$ -tiefen Maklerkammer oder auf einem 130- $\mu\text{m}$ -tiefen Objektträger analysiert worden waren. Dennoch scheint es möglich, dass sich besonders die größeren Sterletspermien mit Kopflängen von ca. 6  $\mu\text{m}$  in der 10- $\mu\text{m}$ -tiefen Messkammer nicht vollkommen frei bewegen können und dadurch die Messwerte geringer ausfallen. Die CASA-Studien zu Seestörsperma von Ciereszko et al. (1996) und Toth et al. (1997) verwendeten 20- $\mu\text{m}$ -tiefe Messkammern.

zu d) Ermittlung anderer Daten aufgrund eines anderen CASA-Systems:

Wie bereits im Material- und Methodenteil erwähnt benötigt man für eine harmonische Videoanalyse eines oszillatorischen Vorgangs wie der Kopfschlagfrequenz (BCF) eine Aufnahmefrequenz, die mindestens doppelt so hoch ist wie die zu messende Frequenz (Davis et al., 1992). Da die zur Verfügung stehende Videokamera lediglich mit einer Frequenz von 50 Hz Bilder aufnehmen konnte, Fischspermien jedoch zu Beginn der Motilitätsphase über 50-mal je Sekunde mit dem Kopf bzw. Schwanz schlagen können, wurde diesem Parameter keine weitere Aufmerksamkeit geschenkt. Beim Vergleich der gemessenen Geschwindigkeiten von Karpfenspermien in einer 20- $\mu\text{m}$ -tiefen Messkammer bei Aufnahmefrequenzen von 67 und 200 Hz stellten Toth et al. (1995) fest, dass die VSL zwar unverändert blieb, die VCL-Werte bei 67 Hz jedoch signifikant höher waren (Mittelwerte: 194 zu 140  $\mu\text{m/s}$ ). Unter der sich daraus ergebenden generellen Schlussfolgerung, dass mit zunehmender Aufnahmefrequenz die VCL-Werte sinken, würde dies für die vorliegende Studie jedoch bedeuten, dass die VCL von Sterletspermien, die mit einer 200-Hz-Videokamera aufgenommen würden, noch niedriger lägen. Ravinder et al. (1997) fanden dahingegen heraus, dass die VCL, VAP und VSL von linear motilen



Karpfenspermien bei höherer Aufnahme Frequenz (60 Hz gegenüber 25 Hz) auch höhere Werte ergeben. Allerdings hatten sie vorher eine Klasseneinteilung vorgenommen und somit nicht den Durchschnitt aller motilen Zellen dargestellt. Spermatozoen mit einem Bewegungsmuster, welches sie als „willkürlich“ („haphazard“) definiert hatten, zeigten nur in den VSL-Werten eine Zunahme, nicht aber bei VAP oder VCL. Der Vergleich dieser Studie mit den vorliegenden Bedingungen, besonders unter Berücksichtigung der Ergebnisse für Karpfenspermien, zeigt, dass die beiden CASA-Systeme in allen vergleichbaren Parametern (VSL, VAP, VCL, Lin, LHD) zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen. Letztendlich müssen die Unterschiede daher auf das gesamte CASA-System als Messeinheit zurückgeführt werden, da auch Unterschiede in der computerinternen Verrechnung der Daten durch die Software - möglicherweise auch bedingt durch die Bildauflösung - nicht auszuschließen sind.

#### **4.1.2.2 Kryokonservierung**

Aus den Ergebnissen und Erfahrungen der vorliegenden Untersuchungen sowie aus den Literaturstudien zum Thema, wird deutlich, dass eine erfolgreiche Kryokonservierung von Fischspermien schwieriger und komplexer ist, als dies z.B. bei Säugerspermien der Fall ist. Reproduzierbare Motilitätsraten von über 50% nach dem Auftauen sind bei Fischspermien zur Zeit noch eher die Ausnahme, bei Säugerspermien hingegen eher die Regel. Ein wichtiger Grund hierfür ist neben der möglicherweise höheren Kryoempfindlichkeit der Fischspermien in der geringeren Forschungsintensität auf diesem Gebiet zu suchen.

Unterschiede in der Kryoempfindlichkeit gibt es jedoch nicht nur zwischen Fisch- und Säugerspermien, sondern auch zwischen den Spermien der einzelnen Fisch- und Säugerarten. Dabei spielen u.a. Unterschiede in der Zellmorphologie, Spermienkonzentration und in der Zusammensetzung des Seminalplasmas eine Rolle. Bei Säugerspermien hat man beispielsweise festgestellt, dass die Plasmamembran der vergleichsweise kryoempfindlichen Eberspermien einen relativ hohen Protein- und niedrigen Cholesteringehalt aufweist. Außerdem wird ihre Glycolipidfraktion von einer Komponente mit hohem Schmelzpunkt bestimmt und der Anteil an Ethanolamin-Phosphoglyzerid (EP) ist hoch (Parks und Graham, 1992). Bei der Kryokonservierung von Fischspermien kommt aufgrund der geringen mitochondrialen Kapazität zur ATP-Synthese neben der Funktionserhaltung der wenigen Mitochondrien vor allem dem Schutz der Energiereserven eine hohe Bedeutung zu. Ist dies nicht gegeben, sind auch nach dem Auftauen ansonsten intakte Zellen nicht mehr in der Lage, sich aktiv fortzubewegen.

Optimale Einfrier- und Auftaubedingungen sind also von Fischart zu Fischart recht unterschiedlich. Folgende Komponenten und ihre Variation spielen bei diesen Prozessen eine entscheidende Rolle:

1. Spermaqualität vor dem Einfrieren: Bedingt z.B. durch den Laichreifegrad beim Abstreifen, die Sauberkeit bei der Abnahme und die Lagerungsbedingungen (Temperatur, Dauer, Belüftung)
2. Komposition des Kryomittels: Konzentration von Medium (Salze, Puffer), Kryoprotektivum (z.B. DMA) und kryoprotektiven Zusätzen (z.B. Zucker, Proteine)
3. Mischungsverhältnis Sperma/Kryomittel (z.B. 1:5) und Dauer der Equilibrierung
4. Art (z.B. automatisch in Pailletten) und Profil des Einfrierens (Gefriereschwindigkeit)
5. Lagerungstemperatur (flüssiger Stickstoff/Tiefkühltruhe) und -dauer
6. Auftaugeschwindigkeit und Behandlung nach dem Auftauen (z.B. Auftau- oder Inkubationsflüssigkeit, Lagerungsart und -dauer)
7. Ermittlung der Spermaqualität nach dem Auftauen (Motilität/Fertilität/andere - Benutzung geeigneter Methoden, Medien und Mischungsverhältnisse)

In einer sehr aufwändigen systematischen Studie mit Spermaproben von neun verschiedenen Cyprinidenarten, die zur Ermittlung der Spermaqualität das gleiche CASA-System wie in der vorliegenden Arbeit (Stroemberg/Mika) - allerdings mit etwas abweichenden Systemeinstellungen - verwendete, überprüften Lahnsteiner et al. (2000) eine Vielzahl der oben aufgeführten Parameter. Dabei variierten sie u.a. die Art und Konzentration von internen (DMA, DMSO, EG, Glycerin, Methanol, Propandiol: jeweils 5, 10 und 15%) und externen Kryoprotektiva (Hühnereiweiß: 5, 10 und 15%; RSA: 0,75 und 1,5%; Phosphatidylcholin: 0,005, 0,01 und 0,05%; Fructose, Glucose, Glycin, Lactose, Sorbitol, Sucrose: jeweils 0,5 und 1%), die Equilibrierzeit (3, 5 und 10 min) und -temperatur (4 und 15°C) sowie die Einfrier- (-82 – -105°C) und die Auftautemperatur (20, 25 und 30°C). Unverändert blieb das Einfriermedium („BSMIS“ bestehend aus jeweils 75 mM NaCl und KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgSO<sub>4</sub> und 20 mM Tris, pH 8) und das Mischungsverhältnis von Sperma zu Kryomittel (1:7). Beste Motilitätsergebnisse nach dem Auftauen von durchschnittlich über 50% erzielten sie bei fast allen untersuchten Arten mit einem Kryomittel bestehend aus BSMIS + 10% DMSO + 0,5% Glycin, kurzer Equilibrierzeit (3 min), einer Einfriertemperatur zwischen -85 und -90°C (entsprechend 23–30°C/min) und einem Auftauprofil von 15–45 s bei 25°C (entsprechend 295–825°C/min).

Diese Ergebnisse zeigen einerseits, dass der Kryoe Erfolg von vielen der oben genannten Faktoren abhängt, andererseits geben sie Hoffnung, dass reproduzierbare Motilitätswerte von über 50% mit kryokonservierten Cyprinidenspermien möglich sind. Der Zusatz der Aminosäure Glycin zum Kryomittel als externes Kryoprotektivum ist ein neuer Ansatz, der auch für die vorliegenden Kryoprotokolle überprüft werden sollte. Die Erkenntnisse zu den Auftauprofilen bestätigen die hier gemachten

Beobachtungen und präzisieren die optimalen Auftauraten. Die Ergebnisse zur Einfriergeschwindigkeit sind ebenso wertvoll für eine Verbesserung der Spermaqualität nach der Kryokonservierung. Für Fischsperma werden oft Einfrierprofile mit Gefrierschritten schneller als 5°C/min bevorzugt. Diese Bedingungen konnten mit dem während der Kryoversuche vorhandenen Einfriergerät nicht erreicht werden. Die provisorische Vorrichtung für Gefrierprofil III gewährleistete zwar eine schnellere Gefriertrate, jedoch waren die Bedingungen von Gefriervorgang zu Gefriervorgang nicht exakt reproduzierbar.

Insgesamt war die Reproduzierbarkeit der Kryoergebnisse unbefriedigend. So zeigten auch die Kryovarianten, die mit den automatisch gesteuerten Gefrierprofilen I und II eingefroren worden waren, relativ große Schwankungen in der Motilität nach dem Auftauen. Diese Schwankungen sind nicht eindeutig zu erklären und sind wahrscheinlich in der Empfindlichkeit der Spermazellen bei geringfügigen Abweichungen von den optimierten, vielschichtigen Bedingungen begründet.

Letztendlich scheint nach dem heutigen Erkenntnisstand eine Steigerung der Motilitätswerte nach dem Auftauen auf reproduzierbare Werte von 50% und darüber durchaus auf der Grundlage der hier entwickelten Kryomethoden möglich zu sein. Hierzu bedarf es jedoch noch weiterer Forschungstätigkeit, um die optimalen Bedingungen zu finden, zu kontrollieren und zu reproduzieren. Wichtige Ansatzpunkte dabei sind optimierte Kryomittel, schnellere Einfrierraten und insgesamt kontrolliertere Kryobedingungen.

Für den angestrebten Motilitätstest ist jedoch vor allem die Stabilität der aufgetauten Probe wichtig. Um Wirkungen auf niedrigem Niveau messen zu können, müssen die Spermaproben nach dem Auftauen einige Zeit mit dem Testgut inkubiert werden können. Die Motilität der aufgetauten Proben nimmt beim jetzigen Stand der Dinge während der Lagerung innerhalb weniger Minuten rasch ab, so dass sie für einen Test nicht in Frage kommen. Wie an anderer Stelle bereits erwähnt, berichtet eine Studie von Steigerungen der Motilität von Glycerin-kryokonservierten Karpfenspermien nach dem Auftauen durch Inkubation in NaCl- und KCl-Lösungen von 250–300 mM (Linhart & Cosson, 1997). Beste Werte von  $80\pm 10\%$  konnten dabei durch zehnmütige Inkubation in 275 mM NaCl erzielt werden. Nach längerer Inkubation nahmen die Motilitätswerte wieder ab, erreichten jedoch nach 20 min noch  $67\pm 6\%$  und nach 60 min immerhin noch  $17\pm 6\%$ . In KCl-Lösungen von 200 mM, wie sie auch in der vorliegenden Arbeit für die Immobilisierung verwendet, beobachteten sie nach mehrminütiger Inkubation ebenfalls Steigerungen der Motilität, die jedoch maximal nur etwa 40% erreichten. Derartige Verbesserungen in der Motilität von aufgetauten Karpfenspermien während der Lagerung in Immo1 (200 mM KCl) oder ImmoS (200 mM KCl + 200 mM Sucrose) wurden unter den hier eingesetzten Bedingungen nicht festgestellt. Einschränkend muss hinzugefügt werden, dass die Motilität in der zitierten Studie nur

geschätzt wurde. Dennoch ist dieser Ansatz vielversprechend und sollte bei zukünftigen Untersuchungen auf jeden Fall berücksichtigt werden.

#### 4.1.3 Korrelation Motilität/Fertilität

Die Kryokonservierung von Fischspermaproben im Hinblick auf ihre *in vitro* - Befruchtungsfähigkeit nach dem Auftauen stellt in der Regel kein Problem dar. Bei Zellkonzentrationen um  $1 \cdot 10^9$  Spz/ml und darüber reicht ein geringer Prozentsatz ( $< 10\%$ ) an motilen Zellen aus, um eine erfolgreiche Befruchtung durchzuführen. Bei Karpfen haben Magyary et al. (1996b) ein optimales Spermien/Ei-Verhältnis von ca.  $1 \cdot 10^5/1$  ermittelt. Bei einer angenommenen Zellkonzentration von  $20 \cdot 10^9$  Spz/ml mit 50%iger Motilität und einem Mischungsverhältnis von 1 ml Sperma zu 1 g Eier (ca. 1000 Stck.) reicht nach dem Auftauen schon 1% Motilität aus, um ein Verhältnis von  $1 \cdot 10^5$  motile Spermien pro Ei zu erhalten. Bei dieser exemplarischen Rechnung muss einschränkend darauf hingewiesen werden, dass eventuelle Beeinträchtigungen des Befruchtungsvorgangs durch Kryomittel oder andere hemmende Einflüsse nicht berücksichtigt sind.

Eine direkter Zusammenhang zwischen Motilität und Fertilität konnte in der vorliegenden Studie weder in den Sterlet- noch in den Karpfenversuchen beobachtet werden. Dies widerspricht teilweise den Angaben von Magyary et al. (1996b), die eine starke positive Korrelation ( $r = 0,85$ ) von aufgetauten Karpfenspermien und ihrer Befruchtungsrate unter optimalen Bedingungen ermittelten. Diese optimalen Bedingungen waren ein Volumenverhältnis von Spermien/Eiern/Wasser von 1/20/20 und ein Spermien/Ei - Verhältnis von  $1,0-1,5 \cdot 10^5/1$ , wie es auch in der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurde. Einige Parameter, wie die Art des Kryoprotektivums (DMSO vs. DMA) und die Reihenfolge der Zugabe der Befruchtungskomponenten zu den Eiern, waren jedoch unterschiedlich. Linhart et al. (2000) ermittelten ebenfalls gute Korrelationskoeffizienten von  $r = 0,53$  bei Spermien/Ei - Verhältnissen von  $2,0 \cdot 10^5:1$ , allerdings nur mit nativen und nicht mit aufgetauten Karpfenspermien. Erstaunlicherweise fanden sie ähnliche Korrelationskoeffizienten zwischen der Befruchtungsrate, die sie mit aufgetauten Spermien erzielten und der Motilitätsrate derselben Spermien vor dem Einfrieren.

Wahrscheinlich können starke Korrelationen zwischen Motilität und Fertilität nur innerhalb eines engen Fensters belegt werden. Dieses ist abhängig von der Konzentration und dem Volumen der Spermien und Eier, der Befruchtungsmethode sowie von anderen Parametern wie den Equilibrierungs-, Immobilisierungs- und Aktivierungsbedingungen. Dass optimale Befruchtungsergebnisse auch noch bei Spermien/Ei - Verhältnissen von  $3 \cdot 10^3/1$  oder darunter erzielt werden können, wurde z.B. für die einmicropylen Eier vom Afrikanischen Kiemensackwels (Rurangwa et al., 1998) und für die multi-micropylen Eier vom Sterlet (Jähnichen et al. 1999) ermittelt. Erst unterhalb dieser mindestens