

5 Zusammenfassung / Summary

In der vorliegenden Dissertation wurde geprüft, inwieweit Fischspermien als Indikatorzellen für einen Fertilitätstest zur Bewertung aquatischer Umweltchemikalien und Abwasserproben verwendet werden können. Vor dem Hintergrund der Gefährdung von Mensch und Umwelt durch reproduktionstoxische Substanzen mit endokrinen Wirkungen hat der deutsche Gesetzgeber den Parameter Fertilität bzw. Reproduktionstoxizität in umweltrelevanten Gesetzen berücksichtigt. Ein praktikables und standardisierbares Testverfahren zur Bewertung dieser Toxizität fehlt aber bisher.

Fischspermien wurden ausgewählt, da sie ökologisch relevant und im Vergleich zu Keimzellen anderer Wasserorganismen relativ gut verfügbar sind. Die uneingeschränkte Beweglichkeit (Motilität) der Spermien ist eine Hauptvoraussetzung für eine erfolgreiche Befruchtung. Die Motilität ist mit Hilfe von computergestützter Videomikrographie (CASA = computer assisted sperm analysis) gut messbar. Ein weiterer Vorteil bei der Verwendung von Fischspermazellen ist, dass Tiere weder bei der Gewinnung des Spermas noch bei der Durchführung des Tests zu Schaden kommen. Außer der Motilität wurden als mögliche Endpunkt-Alternativen der ATP-Gehalt und die Membranintegrität der Spermazellen geprüft.

Im ersten Teil der Experimente wurde nach geeigneten Fischarten gesucht. Als Qualitätskriterium wurden vor allem die Motilitätseigenschaften der Spermatozoen herangezogen. Um die ganzjährige Verfügbarkeit von qualitativ einheitlichem Zellmaterial sicherzustellen, wurden die Spermien außerdem tiefgefroren (kryokonserviert). Nach dem Auftauen wurde ihre Motilität erneut gemessen. Das Sperma von Karpfen (*Cyprinus carpio* L.) und Sterlet (*Acipenser ruthenus* L.) erwies sich von allen untersuchten Proben als am besten geeignet.

Unter Laborbedingungen hatten Karpfenspermien nach Aktivierung eine Bewegungsdauer von ein bis maximal zwei Minuten. Die ermittelte Zellkonzentration lag bei $21 \cdot 10^9$ Spermatozoen (Spz)/ml. Die anfängliche Motilitätsrate (20 s nach Aktivierung) aller beweglichen Zellen (Totale Motilitätsrate = TM) betrug $85,0 \pm 4,8\%$ mit einem Anteil von $15,3 \pm 3,2\%$ an lokal motilen Spermien (LoM). Die Geschwindigkeit (VAP) der motilen Zellen erreichte zu diesem Zeitpunkt $79,3 \pm 12,1 \mu\text{m/s}$ und ihre laterale Kopfauslenkung (LHD) $1,2 \pm 0,3 \mu\text{m}$. Der Wert für die Linearität (Lin) lag bei $75,8 \pm 5,9\%$. In Versuchen zur optimalen Messtemperatur zeigte sich, dass, obwohl Karpfen Sommerlaicher sind, sich kühle Temperaturen von $10\text{--}16^\circ\text{C}$ günstiger auf die Motilitätsrate und -dauer auswirken als warme Temperaturen (28°C).

Die Zellkonzentration im Sterletsperma lag im Durchschnitt bei ca. $1 \cdot 10^9$ Spz/ml. Die Motilitätsdauer der Sterletspermien konnte durch den Zusatz von 10 mM CaCl_2 zur Aktivierungslösung von 3–5 auf 5–10 min verlängert werden. Bei Sperma guter Qualität wurde eine Minute nach Aktivierung eine TM von

94,7±2,2% gemessen. Der Anteil an LoM betrug 6,0±1,6%. Die VAP lag bei 94,2±4,3 µm/s, die LHD bei 2,1±0,3 µm und die Lin bei 73,2±2,2%.

Spermproben beider Arten ließen sich mit geeigneten Medien über mehrere Stunden immobilisieren und anschließend ohne nennenswerten Motilitätsverlust aktivieren. Für den angestrebten Fertilitätstest ist dies eine wichtige Voraussetzung, um eine ausreichend lange Inkubationszeit mit dem Testgut gewährleisten zu können. Sterletspermien konnten durch Verdünnung mit einer 1 mM KCl-haltigen Lösung (ImmoA) immobilisiert werden. Bei Karpfen gelang die Immobilisierung durch Verdünnung des Spermias in einer Lösung mit hoher Osmolalität (Immo1; 398 mosM/kg), wie sie aus der Literatur bekannt ist. Um auch die Immobilisierung der kryokonservierten/aufgetauten Karpfenspermien zu gewährleisten, wurde der Lösung später 200 mM Sucrose zugesetzt (ImmoS; 791 mosM).

Beste Kryoergebnisse mit Karpfensperma wurden durch Mischung (1 Teil Sperma + 5 Teile Kryomittel) und Einfrieren mit Kryo3 (15% DMA/200 mM Sucrose), Kryo9 (15% DMA/200 mM Trehalose) und Kryo10 (20% DMA/200 mM Trehalose) erzielt. Als Kryoverdünner wurde in allen drei Fällen das modifizierte Kurokura-Medium (MK2) eingesetzt. Die höchste TM nach dem Auftauen mit annähernd 40% wurde mit Kryo10 erreicht. Mit Sterletsperma konnten bis zu 50% an TM durch Mischung (1 Teil Sperma + 1 Teil Kryomittel) mit KryoB (30% Ethylenglycol (EG)) und KryoC (40% EG) erzielt werden. Bei beiden Arten ergab ein Einfrieren des Spermias mit mittleren Gefrieraten von 6°C/min (Profil I) bzw. 10°C/min (Profil III) bessere Resultate als mit 3°C/min (Profil II). Sucrose-Zusätze von 10–50 mM zu KryoC wirkten sich unter Einstellung von Profil III signifikant günstiger auf die Motilitätsrate von kryokonservierten/aufgetauten Sterletspermien aus als höhere Sucrose-Konzentrationen bzw. kein Sucrose-Zusatz. Mit Profil I ergaben Sucrose-Zusätze von 50–200 mM vergleichsweise noch höhere Werte, die jedoch statistisch nicht signifikant besser waren.

In Befruchtungsversuchen konnte für beide Arten gezeigt werden, dass die unter den oben aufgeführten Bedingungen kryokonservierten Spermien in der Lage sind, frische Eier erfolgreich zu befruchten und einen hohen Anteil an normal entwickelten Embryonen zu produzieren. Gemessen an der Gesamtzahl der pro Ansatz eingesetzten Eier betrug dieser Anteil bei Sterletspermien über 70%, unabhängig davon, ob das Sperma einen Tag oder fast ein Jahr kryokonserviert worden war. Bei kurzzeitiger Kryokonservierung (6 Tage) des Karpfenspermias wurden mit annähernd 80% schwimmfähigen Larven fast identische Werte wie in der Kontrolle mit frischem Sperma erreicht. Das fast ein Jahr konservierte Karpfensperma produzierte im Vergleich dazu nur etwa die Hälfte an normal entwickelten Larven.

Der zweite Teil der Experimente beinhaltete ökotoxikologische Versuche mit verschiedenen Testsubstanzen und einer Abwasserprobe. In drei aufeinander folgenden Phasen wurden Testmethoden für die Endpunkte Motilität, ATP-Gehalt und Membranintegrität entwickelt und so aneinander

angegeben, dass die Ergebnisse der verschiedenen Endpunkte mit nativen und kryokonservierten Spermien vergleichbar wurden. Aufgrund der besseren Verfügbarkeit wurden die Versuche überwiegend mit Karpfensperma durchgeführt. Schon zu Beginn der Versuche stellte sich heraus, dass die Motilitätsrate (Prozentsatz motiler Zellen) im Vergleich zu anderen Motilitätsparametern wie Geschwindigkeit oder Linearität der am besten geeignete Parameter für den Endpunkt Motilität ist. Im Gegensatz zu den Endpunkten ATP-Gehalt und Membranintegrität konnten aufgrund der Empfindlichkeit der aufgetauten Spermaproben Experimente zum Endpunkt Motilitätsrate nur mit nativen Spermaproben durchgeführt werden.

Ab der zweiten Phase der ökotoxikologischen Versuche wurden die Expositionsbedingungen auf 4 h im Eisbad bei Dunkelheit festgelegt. Als Haupttestsubstanzen wurden Cadmium, 4-Nonylphenol, Crotonaldehyd und Rotenon ausgewählt. Je Testsubstanz wurden die Testreihen mindestens zweimal wiederholt ($n \geq 3$). Ab der dritten Phase wurden die Testansätze nach Ende der Inkubationszeit durch Zentrifugation und Resuspendieren gewaschen, um störende Einflüsse während der Messung der Endpunkte zu minimieren.

Der Endpunkt Motilitätsrate reagierte im Vergleich zu den anderen Endpunkten auf alle vier Schadstoffe sowie auf die Abwasserprobe am empfindlichsten, gefolgt vom ATP-Gehalt (Tabelle 18). Mit der DNA-Färbemethode zum Endpunkt Membranintegrität konnten lediglich mit zwei der vier Testsubstanzen sinnvolle Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen ermittelt werden. Auch mit der Abwasserprobe konnten keine schlüssigen Ergebnisse gemessen werden. Die in den Tests zum ATP-Gehalt und zur Membranintegrität eingesetzten kryokonservierten Zellen reagierten in fast allen Fällen empfindlicher als die nativen Spermien.

Tabelle 18: Ermittelte EC50-Werte und G-Stufen aus Phase 3 der ökotoxikologischen Versuche

Testgut	Motilitätsrate		ATP-Gehalt		Membranintegrität	
	nativ	nativ	nativ	kryokonserviert	nativ	kryokonserviert
Cadmium	2,5±1,2 mg/l	18±4 mg/l	5,7±1,4 mg/l	-	-	-
4-Nonylphenol	2,3±0,5 mg/l	3,5±0,4 mg/l	2,2±0,2 mg/l	8,6±1,2 mg/l	4,7±0,7 mg/l	4,7±0,7 mg/l
Crotonaldehyd	0,7±0,4 mg/l	5,1±1,3 g/l	83±29 mg/l	7,1±0,7 g/l	1,3±0,5 g/l	1,3±0,5 g/l
Rotenon	90±172 ng/l	10,4±10,0 µg/l	11,8±4,2 µg/l	-	-	-
Abwasserprobe ¹	G = 512	G = 128	G = 256	-	-	-

¹ aus der chemischen Industrie Bitterfeld; G = Verdünnungsstufe der Abwasserprobe, bei der die Hemmung im Vergleich zur Kontrolle $\leq 30\%$ ist

Beim Vergleich dieser Ergebnisse mit entsprechenden Literaturangaben zu EC50- und G-Werten aus etablierten DIN-Verfahren wie dem Fisch-, dem Daphnien- und dem Algentest zeigte sich, dass der Endpunkt Motilitätsrate ähnlich empfindlich reagiert bzw. sogar deutlich niedrigere EC50-Werte produziert. Dieses Ergebnis wird besonders durch die sehr niedrigen EC50-Werte für Rotenon und die hohen G-Werte für die Motilitätstests mit der Abwasserprobe unterstrichen. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die Expositionsbedingungen durch eine relativ kurze Inkubationszeit und kalte Temperaturen vergleichsweise ungünstiger sind als in den standardisierten Verfahren, sind bei leichter Abwandlung des Testdesigns noch sensitivere Ergebnisse zu erwarten.

Die Eignung der verschiedenen untersuchten Fischarten, die Praktikabilität der angewendeten Methoden zur Bestimmung der Endpunkte und zur Kryokonservierung sowie die Einsetzbarkeit der entwickelten Testverfahren werden vor dem Hintergrund der Literaturangaben bewertet und diskutiert. Der notwendige Verbesserungs- und Forschungsbedarf wird aufgezeigt. Es kann festgestellt werden, dass durch die vorliegenden Untersuchungen neue Ansätze für empfindliche aquatische Testverfahren entwickelt wurden, die ohne den Einsatz von Tieren auskommen und die in Zukunft als Fertilitätstests oder als Bestandteile davon eingesetzt werden können.

Summary

The dissertation at hand analyzes the degree to which fish sperm can be employed as indicator cells for a fertility test in the evaluation of aquatic environmental chemicals and sewage samples. Due to the threat posed to humans and the environment by reproduction-toxic substances with endocrine-disruptive effects, German lawmakers have taken into consideration the parameter fertility/reproduction toxicity in cases of environmentally relevant laws. Until now, however, a practical test fit for standardizing the evaluation of this toxicity has been lacking.

Fish sperm were selected because they are ecologically relevant and are, compared to the gametes of other water organisms, relatively abundant and available. The unrestricted motility of the sperm is a major precondition for successful fertilization. Motility is easily measured by means of computer assisted sperm analysis (CASA). A further advantage of using fish sperm cells is that animals are harmed neither during sperm collection nor during the test procedure itself. In addition to motility, potential endpoint alternatives ATP content and membrane integrity of fish sperm were also tested. In the first phase of research suitable fish species were sought. Most important among the qualifying criteria were the motility characteristics of the spermatozoa. In order to insure the year-round availability of qualitatively uniform cell material, the sperm were deep-frozen (cryopreserved). After thawing their motility was re-

assessed. Carp (*Cyprinus carpio* L.) and sterlet (*Acipenser ruthenus* L.) sperm proved to be the best-suited of all the investigated samples.

Under laboratory conditions carp sperm had a post-activation motility period of 1 to 2 minutes maximum. The cell concentration was determined to be around $21 \cdot 10^9$ spermatozoa (spz)/ml. The initial motility rate (20 s post-activation) of all forward progressive cells (total motility rate = TM) amounted to $85,0 \pm 4,8\%$ with a percentage of $15,3 \pm 3,2\%$ consisting of locally motile sperm (LoM). The velocity (VAP) of the motile cells reached $79,3 \pm 12,1 \mu\text{m/s}$ and the lateral head displacement (LHD) $1,2 \pm 0,3 \mu\text{m}$. The figure for the linearity (Lin) was found at $75,8 \pm 5,9\%$. Trials conducted to determine the optimal measuring temperature demonstrated that, although carp sperm are summer spawners, cool temperatures between $10\text{--}16^\circ\text{C}$ have a more desirable effect on motility rate and motility period than warm temperatures (28°C).

The cell concentration among sterlet sperm reached approximately $1 \cdot 10^9$ spz/ml. The motility period of the sterlet sperm could be extended from 3–5 to 5–10 min by addition of 10 mM CaCl_2 to the initiating solution. With sperm of selective quality a TM of $94,7 \pm 2,2\%$ could be recorded one minute after activation. The percentage attributed to LoM was $6,0 \pm 1,6\%$. The VAP was $94,2 \pm 4,3 \mu\text{m/s}$, the LHD $2,1 \pm 0,3 \mu\text{m}$, and the Lin $73,2 \pm 2,2\%$.

The use of appropriate media allowed sperm samples of both species to be immobilized for several hours and eventually re-activated without any notable loss of activity. This is an important prerequisite for the intended fertility test in order to guarantee a sufficiently long incubation period with the test material. Sterlet sperm could be immobilized by diluting them in a solution containing 1 mM KCl (ImmoA). Successful immobilization of the carp sperm was achieved by diluting them in a high-osmolality solution (Immo1; 398 mosM/kg), as is commonly known from the literature. In order to insure immobilization of cryopreserved/thawed carp sperm, 200 mM of sucrose (ImmoS; 791 mosM) was added subsequently to the solution.

The best post-thaw motility results were obtained when sperm were mixed (1 part sperm + 5 parts cryo-diluent) and frozen with Cryo3 (15% DMA/200mM sucrose), Cryo9 (15% DMA/200 mM trehalose), and Cryo10 (20% DMA/200 mM trehalose). The modified Kurokura medium was employed to serve as cryo-extender in all three cases. The highest post-thaw TM value of nearly 40% was reached with Cryo10. Comparatively, nearly 50% of TM was yielded with frozen/thawed sterlet sperm when mixed (1 part sperm + 1 part diluent) with CryoB (30% ethylenglycol (EG)) and CryoC (40% EG). Freezing rates of $6^\circ\text{C}/\text{min}$ (profile I) and $10^\circ\text{C}/\text{min}$ (profile III), respectively, produced better results than $3^\circ\text{C}/\text{min}$ (profile II). When profile III was employed the addition of 10–50 mM to CryoC produced significantly better motility rates of frozen/thawed sterlet sperm than higher sucrose concentrations or no sucrose

addition, respectively. Using profile I together with the sucrose additive in concentrations of 50–200 mM exhibited even higher post-thaw motility values, although they were not statistically significant.

Fertility tests with both species clearly showed that, under the freezing conditions described above, cryopreserved sperm are capable of successfully fertilizing fresh eggs and furthermore, of yielding a high percentage of normally developed embryos. This percentage, calculated from the total number of eggs used per batch, was found to be over 70% for sterlet sperm, regardless of how long the sperm had been preserved - one day or nearly an entire year. Fertility tests with carp sperm cryopreserved for short-term (6 days) led to hatching rates and percentage of swim-up stage larvae of approximately 80%, which was almost identical to the control batch with fresh sperm. Carp sperm that had been preserved for nearly a year produced around half of these values.

The second part of the experiments contains ecotoxicological tests with various substances and one sewage sample. The endpoints motility, ATP content, and membrane integrity were developed and attuned to each other in three consecutive stages, such that the results of the different endpoints could be compared both with native and cryopreserved sperm. Because they are more readily available, primarily carp sperm were used to conduct these trials. It was established promptly in the initial phase that the motility rate (percentage of motile cells) was the best-suited parameter for the endpoint motility, as compared to other potential parameters such as velocity or linearity. In contrast to the endpoints ATP content and membrane integrity, tests evaluating the endpoint motility rate could be performed only with native sperm, due to the storage sensitivity of the thawed sperm samples.

Beginning with the second phase of the ecotoxicological trials, procedural conditions were set at 4 hours on crushed ice in the dark. Cadmium, 4-nonylphenol, crotonaldehyde, and rotenone were selected as main test substances. The test series were repeated at least twice ($n \geq 3$) for each individual substance. Beginning with the third experimental phase the cells were washed after completion of the incubation period by means of centrifugation and resuspending. This was done in order to minimize potentially disruptive factors during measurement of the endpoints.

Compared to the other endpoints, motility rate reacted most sensitively (followed by ATP content - see Table 18) to all four toxins as well as to the sewage sample. The DNA-staining method used for the endpoint membrane integrity indicated in only two out of four test substances credible concentration-effect relationships. Neither could any conclusive results be measured in the case of the sewage sample. The cryopreserved cells employed in both tests for ATP content and membrane integrity reacted in nearly all cases more sensitively than the native sperm.

Table 18: EC50- and G-values determined in phase 3 of the ecotoxicological experiments

Test material	motility rate		ATP content		membrane integrity	
	fresh	fresh	fresh	cryopreserved	fresh	cryopreserved
cadmium	2,5±1,2 mg/l	18±4 mg/l	5,7±1,4 mg/l	-	-	-
4-nonylphenol	2,3±0,5 mg/l	3,5±0,4 mg/l	2,2±0,2 mg/l	8,6±1,2 mg/l	4,7±0,7 mg/l	4,7±0,7 mg/l
crotonaldehyde	0,7±0,4 mg/l	5,1±1,3 g/l	83±29 mg/l	7,1±0,7 g/l	1,3±0,5 g/l	1,3±0,5 g/l
rotenone	90±172 ng/l	10,4±10,0 µg/l	11,8±4,2 µg/l	-	-	-
sewage sample ¹	G = 512	G = 128	G = 256	-	-	-

¹ from the chemical industry in Bitterfeld; G = dilution factor of the sewage sample, where in comparison to the control the inhibition is ≤ 30%

A comparison of these results with related reports in the literature on EC50- and G-values from established DIN procedures such as the fish, daphnia, and algae tests shows that the endpoint motility rate reacts in a similarly sensitive way, or produces even remarkably lower EC50-values. This conclusion is especially emphasized by the very low EC50-values for rotenone and the high G-values in the motility tests with the sewage sample. Taking into consideration the fact that the procedural conditions here, i.e. a relatively short incubation period and cold temperatures, are comparatively less favorable than in the standardized methodology, even more sensitive results could be expected if the test design were slightly modified.

The suitability of the various fish species investigated, the practicability of the applied methods for determination of the endpoints and for cryopreservation, and the implementation of the developed test procedures is evaluated and discussed within the context of the already existing literature. Suggestions for improvement and further research are pointed out. It can be confirmed that new bases for sensitive aquatic test procedures were developed through the analyses at hand, ones that can be carried out without the use of animals and can serve in the future as fertility tests or components thereof.