

3 Ergebnisse

Im ersten Ergebnisteil (3.1) werden die allgemeinen Motilitätseigenschaften von frischen Karpfen- und Sterletspermien, wie sie unter den im Material- und Methodenteil dargestellten Bedingungen ermittelt wurden, vorgestellt. Danach werden Ergebnisse aus Kryokonservierungsversuchen mit Spermien beider Arten präsentiert. Die durch den Einfrier- und Auftauprozess veränderten Motilitätseigenschaften werden dargestellt. Ergebnisse aus Befruchtungsversuchen mit nativen und kryokonservierten Spermazellen schließen den ersten Teil ab. Teil 3.2 befasst sich mit der ökotoxikologischen Verwendbarkeit von nativen und kryokonservierten Fischspermien. Einzelstofftests mit Chemikalien aus unterschiedlichen Substanzklassen werden ebenso vorgestellt wie die dazugehörigen Effektkonzentrationen (EC50) bei den drei untersuchten Endpunkten Motilität, Adenosin 5'-Triphosphat (ATP)-Gehalt und Membranintegrität.

3.1 Teil I: Motilität, Kryokonservierung und Befruchtung

3.1.1 Motilitätseigenschaften von nativen Karpfen- und Sterletspermien

Da eine qualitative Vorauswahl (hohe Motilitätsraten) getroffen wurde, bevor die gewonnenen Spermaproben in Versuchen oder zur Kryokonservierung eingesetzt wurden, sind die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Spermaeigenschaften nicht repräsentativ oder zu verallgemeinern. Bei optimaler Hälterung, Fütterung, Hypophysierung und sonstiger geeigneter Behandlung kann jedoch von der Mehrzahl der laichreifen Fische (hier: Karpfen und Sterlet) Sperma von guter bis sehr guter Qualität gewonnen werden. Bei Karpfen kann bei kontrollierter Warmwasserhälterung sogar das ganze Jahr hindurch qualitativ gutes Sperma abgestreift werden.

Die Osmolalität der gemessenen Seminalplasmaproben von Karpfen ($n = 128$) betrug 257 ± 31 mosM/kg. Die Osmolalität der Proben der „Versuchsfeld-Karpfen“ lag bei hypophysierten ($n = 40$) jedoch signifikant ($p \leq 0,01$) höher als bei nicht-hypophysierten ($n = 59$) Tieren (271 ± 9 mosM/kg gegenüber 258 ± 29 mosM/kg). Aufgrund der qualitativen Vorauswahl wurde lediglich etwa ein Drittel aller gewonnenen Spermaproben für weitergehende Versuche bzw. zur Kryokonservierung verwendet.

Tabelle 9: Motilitätseigenschaften von frischen Karpfen- und Sterletpermien

Messzeitpunkte:	Karpfen			Sterlet		
	20 s	40 s	60 s	1 min	3 min	5 min
Zellkonz. [$\cdot 10^9/\text{ml}$]	20,7 \pm 2,7	21,1 \pm 2,4	21,4 \pm 2,5	0,9 \pm 0,3	1,0 \pm 0,4	1,0 \pm 0,5
Totale Motilität [TM, %]	85,0 \pm 4,8	68,1 \pm 8,0	48,4 \pm 14,4	94,7 \pm 2,2	91,6 \pm 4,0	83,4 \pm 6,0
Lokal Motile [LoM, %]	15,3 \pm 3,2	31,3 \pm 16,2	42,9 \pm 10,3	6,0 \pm 1,6	10,1 \pm 6,3	34,8 \pm 13,4
LHD [μm]	1,2 \pm 0,3	0,7 \pm 0,2	1,5 \pm 0,7	2,1 \pm 0,3	1,8 \pm 0,4	2,4 \pm 0,5
Linearität [%]	75,8 \pm 5,9	85,0 \pm 3,1	62,2 \pm 18,2	73,2 \pm 2,2	73,7 \pm 3,2	59,5 \pm 6,7
Motile [M, %]	69,7 \pm 3,9	36,9 \pm 17,7	5,5 \pm 4,8	88,6 \pm 3,3	81,5 \pm 8,3	48,6 \pm 19,2
VCL M [$\mu\text{m/s}$]	84,9 \pm 13,2	49,9 \pm 4,1	55,8 \pm 8,9	116,9 \pm 2,2	87,3 \pm 8,0	70,2 \pm 7,5
VAP M [$\mu\text{m/s}$]	79,3 \pm 12,1	43,2 \pm 5,4	37,3 \pm 2,6	94,2 \pm 4,3	73,7 \pm 4,6	50,3 \pm 3,5
VSL M [$\mu\text{m/s}$]	61,5 \pm 6,6	39,8 \pm 5,7	29,5 \pm 7,9	82,1 \pm 2,6	63,6 \pm 4,9	37,6 \pm 6,5
Linear M [LM, %]	51,9 \pm 13,3	83,8 \pm 4,6	56,3 \pm 29,4	55,1 \pm 8,1	66,0 \pm 10,2	44,6 \pm 14,2
VCL LM [$\mu\text{m/s}$]	82,3 \pm 14,0	46,9 \pm 4,9	45,9 \pm 2,7	113,8 \pm 0,9	87,3 \pm 8,0	70,2 \pm 7,5
VAP LM [$\mu\text{m/s}$]	79,5 \pm 13,5	42,8 \pm 5,2	38,0 \pm 1,3	96,7 \pm 4,4	76,5 \pm 4,3	54,1 \pm 2,0
VSL LM [$\mu\text{m/s}$]	76,7 \pm 12,6	41,7 \pm 5,2	37,0 \pm 1,1	96,1 \pm 0,4	72,4 \pm 6,7	50,6 \pm 0,2
Nicht-LM [NLM, %]	47,2 \pm 13,2	15,9 \pm 4,1	39,0 \pm 23,6	43,6 \pm 7,6	32,9 \pm 9,1	54,4 \pm 14,1
VCL NLM [$\mu\text{m/s}$]	88,5 \pm 10,6	63,8 \pm 4,1	64,1 \pm 8,0	118,7 \pm 2,7	86,3 \pm 7,9	69,2 \pm 9,7
VAP NLM [$\mu\text{m/s}$]	79,9 \pm 10,5	45,7 \pm 6,5	38,3 \pm 4,1	91,6 \pm 5,5	68,0 \pm 6,7	47,3 \pm 4,2
VSL NLM [$\mu\text{m/s}$]	47,6 \pm 6,3	31,2 \pm 5,1	24,1 \pm 7,9	71,0 \pm 4,7	46,9 \pm 5,7	32,0 \pm 7,7
Hyperaktive [H, %]	0,9 \pm 0,8	0,3 \pm 0,5	0,6 \pm 1,2	1,3 \pm 1,0	1,1 \pm 1,4	1,0 \pm 0,5
VCL H [$\mu\text{m/s}$]	107,9 \pm 3,8	130,6 \pm 37,0	85,9	124,9 \pm 9,8	103,8	106,8 \pm 3,2
VAP H [$\mu\text{m/s}$]	77,7 \pm 9,8	67,6 \pm 7,0	32,4	73,2 \pm 7,9	56,5 \pm 6,2	47,1 \pm 4,2
VSL H [$\mu\text{m/s}$]	25,8 \pm 5,6	16,6 \pm 15,8	16,0	44,9 \pm 2,8	38,2	35,4 \pm 3,7
Kreisläufer [KL, %]	0	0,0 \pm 0,0	0,2 \pm 0,4	0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,1
VCL KL [$\mu\text{m/s}$]	-	37,4	54,0	-	42,4	n.v.
VAP KL [$\mu\text{m/s}$]	-	30,1	31,1	-	30,7	31,0
VSL KL [$\mu\text{m/s}$]	-	27,9	28,3	-	28,1	n.v.

Karpfen: n = 5; ca. 2 h (Durchschnitt) nach dem Abstreifen; Verdünnung: 1:10 Immo1 + 1:10 Ini4Ca; Messtemperatur: ca. 15°C; Sterlet: n = 6 (VCL- und VSL-Daten: n = 2); Messung ca. 2,5 h (Durchschnitt) nach dem Abstreifen; Verdünnung: 1:5 (n = 5) bzw. 1:3 (n = 1) mit IniCa; Messtemperatur: ca. 10°C; n.v. = nicht vorhanden; Erklärung der Messparameter und der Klassifizierung der Spermien in

In Tabelle 9 sind die mittels computergestützter Videomikrographie ermittelten Daten zu den Motilitätseigenschaften von frischen Karpfen- und Sterletpermien gegenübergestellt. Beide Arten unterschieden sich darin relativ deutlich. Abgesehen von der Zellkonzentration, die im Sterlet sperma mit

ca. $1 \cdot 10^9$ Zellen/ml ungefähr 20-mal niedriger war als im Karpfensperma, waren die meisten Werte von Sterletspermien höher als die von Karpfenspermien. Sterletspermien waren in der Lage, sich bis zu 10 min nach dem Auslösen der Motilität aktiv vorwärts zu bewegen, wohingegen Karpfenspermien nach maximal 2 min immotil waren. Fünf Minuten nach Beginn der Bewegung lag die totale Motilität der Sterletspermien unter den angegebenen Bedingungen noch über 80%, wobei ca. 35% lokal motile Zellen enthalten waren. Bei Karpfenspermien waren bereits nach 60 s nur noch etwa 50% der Zellen beweglich, wobei der Großteil lokal-motil war. Allerdings waren auch die Motilitätsraten zu Beginn der Bewegungsphase bei Sterletspermien mit ca. 95% um 10 Prozentpunkte höher als bei den Karpfenspermien, deren Anteil an lokal motilen Zellen mit anfänglich 15% wiederum um etwa 10 Prozentpunkte höher lagen.

Der Prozentsatz lokal motiler Zellen nahm bei beiden Arten mit der Dauer der Bewegungsphase deutlich zu. Die laterale Kopfauslenkung (LHD) war bei Karpfenspermien (0,7–1,5 μm) durchgängig etwa um 1 μm geringer als bei Sterletspermien, was jedoch auch mit der Kopfmorphologie zusammen hängen kann (runder gegenüber länglichem Kopf). Bei beiden Arten war die LHD in der Mitte der Motilitätsphase am niedrigsten, am Ende am höchsten. Mit dem Parameter Linearität verhielt es sich umgekehrt. Die Werte für die Karpfenspermien lagen dabei etwas höher als die für die Sterletspermien. Die größte Linearität wurde mit 85% nach 40 s bei Karpfenspermien gemessen. Dieser Wert steht im Einklang mit dem hohen Anteil an linear motilen Zellen von ca. 84%. Auch dieser Wert war der vergleichsweise höchste; der Anteil linear motiler Zellen bewegte sich bei beiden Arten sonst durchschnittlich zwischen 45% und 65%.

Die Klasse der nicht-linear motilen Spermien machte mit einer Ausnahme (54% nach 5 min bei Sterletspermien) und durchschnittlich 16–47% bei beiden Arten den zweithöchsten Anteil an motilen Zellen aus. Dieser Parameter war in der Mitte der Motilitätsphase am niedrigsten. Der Anteil hyperaktiver Zellen war bei beiden Arten mit ca. 1% gering. Kreisläufer traten nur vereinzelt auf. Hyperaktive Spermien erreichten bei beiden Arten mit VCL-Geschwindigkeiten (curve line velocity) um 125–130 $\mu\text{m/s}$ die höchsten gemessenen Durchschnittsgeschwindigkeiten. In allen anderen Motilitätsklassen lagen die Geschwindigkeiten der Sterletspermien deutlich über denen der Karpfenspermien. Naturgemäß sind die VCL-Werte am höchsten und die VSL-Zahlen (straight line velocity) am niedrigsten. Die Geschwindigkeit entlang der gemittelten Bahn (VAP = averaged path velocity) von motilen Sterletspermien sank im Mittel von anfänglich knapp 100 $\mu\text{m/s}$ auf etwa die Hälfte nach 5 min. Der VAP-Wert von motilen Karpfenspermien fiel innerhalb einer Minute von ca. 80 $\mu\text{m/s}$ auf unter 40 $\mu\text{m/s}$. Bei beiden Arten unterschieden sich die jeweiligen Geschwindigkeitswerte der Motilitätsunterklassen für linear motile und nicht-linear motile Zellen nur geringfügig von den Werten der Klasse „motile Zellen“.

Aufgrund der größeren Bedeutung und Repräsentativität der Parameter sowie zur übersichtlicheren Darstellung werden im Folgenden überwiegend nur noch Angaben zum Anteil motiler Zellen (Motilitätsrate in %), ihrer VAP-Geschwindigkeit (VAP in $\mu\text{m/s}$), ihrer lateralen Kopfauslenkung (LHD in μm) und ihrer Linearität (%) gemacht. In einigen Fällen wird auch die Totale Motilitätsrate (TM) angegeben, die sich aus der Summe der Anteile motiler und lokal-motiler Zellen ergibt.

3.1.1.1 Einfluss von Calcium auf die Motilität

Der Zusatz von 10 mM CaCl_2 zur Initiatorlösung wirkte sich überaus positiv auf die Motilität der Sterletspermien aus (Abbildung 9). Die Motilitätsdauer konnte von maximal etwa 3 min auf über 5 min gesteigert werden. Die maximale Geschwindigkeit (hier: VAP) und die LHD erhöhten sich ebenfalls durch den Zusatz um 10 $\mu\text{m/s}$ auf 95 $\mu\text{m/s}$ bzw. um 0,4 μm auf ca. 2,1 μm und blieben während der gesamten Motilitätsphase auf einem hohen Niveau. Die Linearität der Spermienbewegung veränderte sich durch den Zusatz nicht.

Bei Karpfenspermien hatte der Calcium-Zusatz einen geringen Einfluss auf die Motilität. Calcium wurde dennoch zugesetzt, da ein großer Teil der Spermien nach Verdünnung in Immo1/Ini4 offenbar einem starken osmotischen Schock ausgesetzt war. Dadurch setzte der Beginn der Bewegung erst mit einiger Verzögerung ein und es kam zu starken Schwanzdeformationen. In einigen Fällen führte die Verdünnung sogar zum Platzen der Zellen. Durch den Zusatz von 10 mM CaCl_2 zu Ini4 (Ini4Ca) konnten diese Effekte minimiert werden.

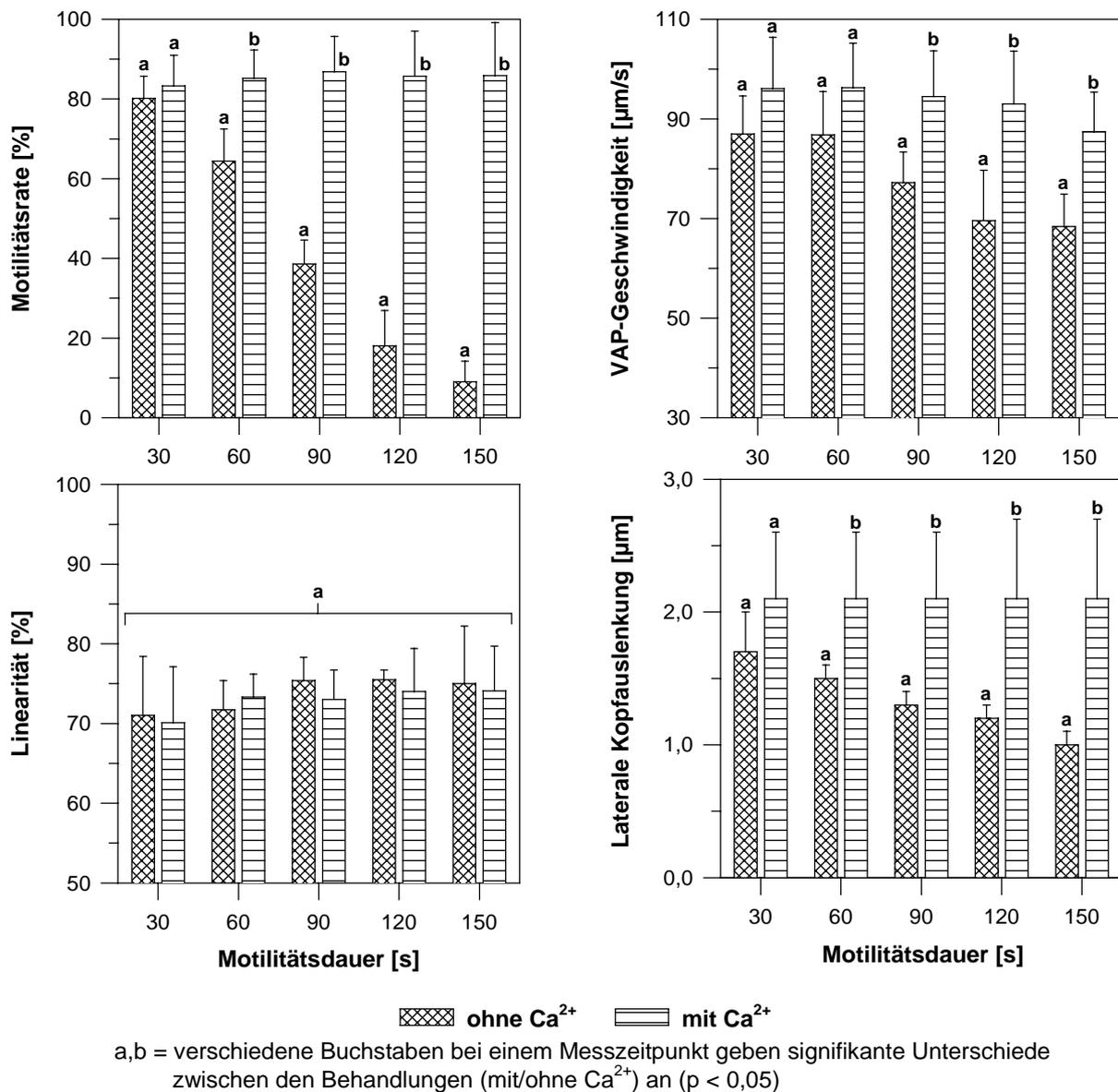


Abbildung 9: Motilitätseigenschaften von frischen Sterletspermien mit und ohne Ca^{2+} -Zusatz

3.1.1.2 Messtemperaturen

An Karpfenspermien konnte durch Variation der Messtemperatur gezeigt werden, dass eine Kühlung des Mikroskoptisches und der Messkammern sinnvoll ist. Bei einer Messtemperatur von 10°C wurden mit frischen Karpfenspermien bei allen Messzeitpunkten signifikant höhere Motilitätsraten erzielt als bei 28°C (Abbildung 10). Zu den Zeitpunkten 45 und 60 s galt dies auch gegenüber der Messtemperatur 16°C , welche wiederum im Vergleich zu 28°C ebenfalls höhere Motilitätsraten hervorrief. Auch die VAP-Geschwindigkeiten waren bei den kühleren Temperaturen zu Beginn der Motilitätsphase signifikant

höher als bei 28°C. Nach 60 s wurden bei 10°C jedoch signifikant niedrigere VAP-Werte gemessen als bei 28°C. Linearität und laterale Kopfauslenkung der Karpfenspermien wurden durch die verschiedenen Messtemperaturen nur wenig beeinflusst. Lediglich zum Messzeitpunkt 45 s ergaben sich für diese Parameter signifikante Unterschiede zwischen 10°C und 28°C.

Da die meisten Karpfenversuche mit frischem Sperma aufgrund der natürlichen Laichzeiten in den Sommermonaten durchgeführt wurden, war eine Kühlung des Mikroskoptisches durch das Peltierelement auf 10°C bei Raumtemperaturen von über 25°C nur unter großem Aufwand (ständige zusätzliche Kühlung mit Eisbeuteln) möglich. Daher wurden alle anderen Versuche bei 15±2°C durchgeführt.

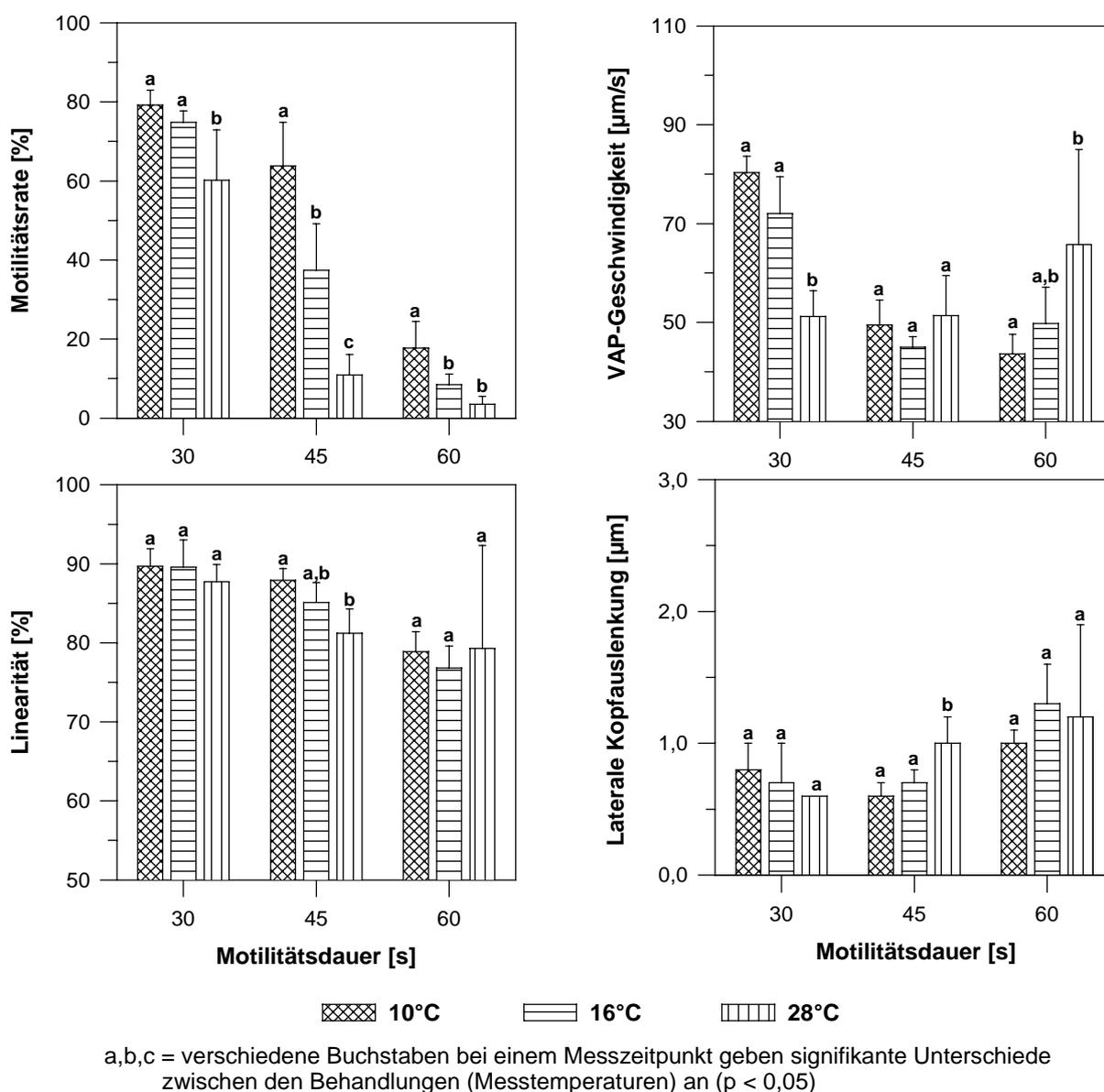


Abbildung 10: Motilitätseigenschaften von frischen Karpfenspermien in Abhängigkeit von der Messtemperatur

3.1.2 Immobilisierungsfähigkeit

In den Immobilisierungsversuchen sollte vor allem überprüft werden, ob und wie lange native und kryokonservierte/aufgetaute Spermien von Karpfen und Sterlet im Ruhezustand belassen werden können, ohne dass größere Qualitätsverluste offenbar werden. Die Phase der möglichen Immobilisierbarkeit sollte in späteren Versuchen als Expositionszeit mit der Testsubstanz genutzt werden. Zusätzlich sollte geprüft werden, inwieweit die von Redondo-Müller et al. (1991) berichtete Regenerationsfähigkeit von Karpfenspermien in KCl-Lösungen von 50–200 mM auf die vorhandenen Proben übertragbar war. Aus diesem Grund wurde in diesem Versuch eine Spermamischprobe von minderer Qualität eingesetzt.

3.1.2.1 Native Spermien

Abbildung 11 zeigt die gemittelten Motilitätseigenschaften von drei Karpfenspermaproben in Abhängigkeit von der Expositionsdauer in Immo1. Die anfänglich schlechte Motilitätsrate (unter 10%) konnte durch die Immobilisierung in Immo1 deutlich gesteigert werden. Bereits nach 1 h war die Motilitätsrate (30 s nach Aktivierung) signifikant auf über 50% gestiegen, nach 2 h erreichte sie ihr Maximum von über 60%. In den folgenden 2,5 h der Inkubation blieben die Werte relativ konstant zwischen 40% und 50%. Insgesamt 5 h nach Beginn der Immobilisierung war ein deutlicher, jedoch nicht-signifikanter Abfall der Motilitätsrate zu verzeichnen. Die unverdünnten Spermaproben erzielten nach gleicher Lagerungszeit signifikant schlechtere Werte. Die Geschwindigkeit (VAP) der Spermien ließ sich durch die Inkubation in Immo1 kurzfristig etwas steigern, fiel aber bereits nach 0,5 h signifikant bis zum Versuchsende auf ein Niveau zwischen 50 und 60 $\mu\text{m/s}$ ab. Die unverdünnte Probe erreichte nach der gleichen Lagerungszeit noch ca. 70 $\mu\text{m/s}$. Die Linearitätswerte schwankten während der Versuchsdauer zwischen 70 und 90%, wobei der Wert der unverdünnten Probe am Ende des Versuchs am höchsten war. Der Mittelwert der lateralen Kopfauslenkung (LHD) der nicht-inkubierten Spermien schwankte zu Beginn des Versuchs stark um etwa 2 μm . Während der folgenden 2 h blieb der Wert relativ konstant bei 1 μm und fiel für weitere 2,5 h auf ein Niveau von 0,6–0,7 μm . Am Ende des Versuchs stieg der Wert nochmals an und lag mit 0,9 μm im Bereich der unverdünnten Proben mit gleicher Lagerungszeit.

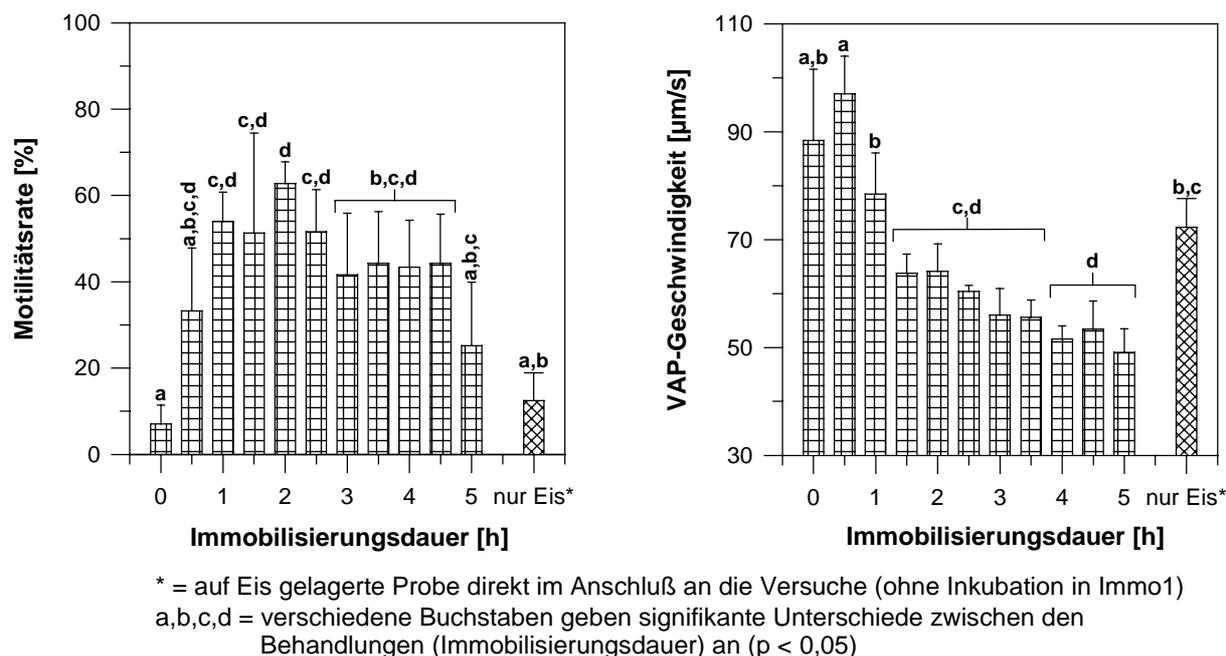
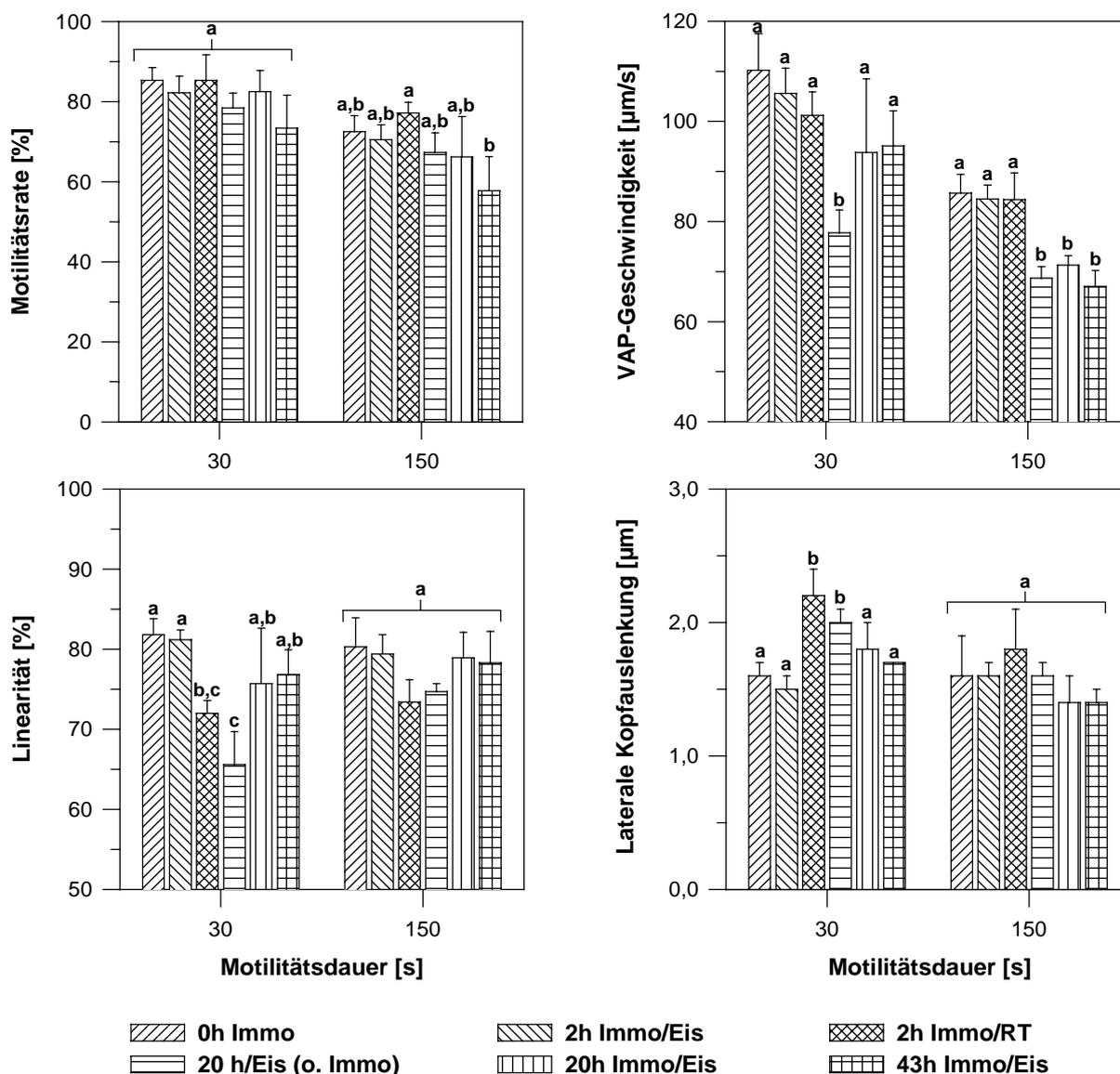


Abbildung 11: Motilitätseigenschaften von frischen Karpfenspermien in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer in Immo1

Die Immobilisierung von frischen Sterletpermien in ImmoA ergab, dass eine bis zu 20-stündige Inkubation im Eisbad keine signifikant negativen Effekte auf die Motilitätsrate ausübt (Abbildung 12). Nach 43 h war die Motilitätsrate lediglich beim Zeitpunkt 150 s gegenüber einem Wert (2 h in ImmoD bei Raumtemperatur) signifikant erniedrigt. Im Vergleich zu den Motilitätswerten war die Abnahme der VAP-Werte mit zunehmender Inkubationszeit deutlicher. Ein signifikanter Unterschied zu den anderen Behandlungen ergab sich hierbei für die Probe, die 20 h ohne Inkubation in Immobilisierungslösung auf Eis gelagert worden war. Zu Beginn der Motilitätsphase (30 s nach Aktivierung) ergaben sich für diese Probe - ähnlich wie für die Probe, die 2 h bei Raumtemperatur (RT) inkubiert worden war - bei den Parametern Linearität und LHD signifikant unterschiedliche Werte zu den anderen Bedingungen. Die zweistündige Inkubation bei RT ergab für die Parameter Motilitätsrate und VAP jedoch keine signifikanten Unterschiede zur zweistündigen Inkubation auf Eis. Beim Messzeitpunkt 150 s zeigte sich, dass die VAP-Werte der 20 h oder länger gelagerten Proben signifikant niedriger waren als die der bis zu 2 h immobilisierten Ansätze.



a,b,c = verschiedene Buchstaben bei einem Messzeitpunkt geben signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen (Immobilisierungsdauer) an ($p < 0,05$)

Abbildung 12: Motilitätseigenschaften von frischen Sterletspermien nach unterschiedlichen Inkubationsbedingungen in ImmoA

3.1.2.2 Kryokonservierte/aufgetaute Spermien

Zwischen den drei Immobilisierungslösungen ergaben sich keine gravierenden Unterschiede bezüglich ihres Effekts auf die kryokonservierten Spermien. Mit allen drei Lösungen war es einerseits möglich, die aufgetauten Sterletspermien zu immobilisieren, und sie andererseits nach 90 Minuten zu reaktivieren. Der Zusatz von Ca^{2+} (ImmoD) war in der eingesetzten Konzentration (1 mM) für die Immobilisierung

weder förderlich noch hinderlich. Die Motilitätsrate der immobilisierten Spermien lag mit durchschnittlich etwa 10% deutlich höher als die der nicht-immobilisierten Spermien am Ende der Versuche (ca. 6%). Die höchste Motilitätsrate (30 s nach Aktivierung) wurde mit 17,8% nach 60-minütiger Immobilisierung in ImmoD erreicht. Die Motilitätsdauer im Vergleich zu der im Eisbad aufbewahrten Probe war nicht beeinträchtigt (ca. 3 min). Die durchschnittliche VAP-Geschwindigkeit nahm mit zunehmender Immobilisierungsdauer (unabhängig von der Lösung) signifikant von durchschnittlich ca. 50 $\mu\text{m/s}$ auf über 60 $\mu\text{m/s}$ zu.

3.1.3 Equilibrierung

3.1.3.1 Variation der Equilibrierdauer

Es zeigte sich, dass schon ein kurzzeitige Equilibrierung (Mischung 1:2) mit KryoE (EG-Endkonzentration 17,5%) die Motilität beeinträchtigte (Abbildung 13). Bereits nach 5 min waren Motilitätsrate, VAP und LHD deutlich reduziert. Die Linearität der Spermien nahm hingegen stark zu. Im Verlauf der ersten 20 min der Equilibrierung nahmen Motilitätsrate und VAP weiter ab, Linearität und LHD blieben relativ stabil. Nach dieser ersten Phase stabilisierte sich auch die Motilitätsrate, die VAP-Geschwindigkeit reduzierte sich bis zum Ende des Versuchs nach 60 min auf ca. 70 $\mu\text{m/s}$.

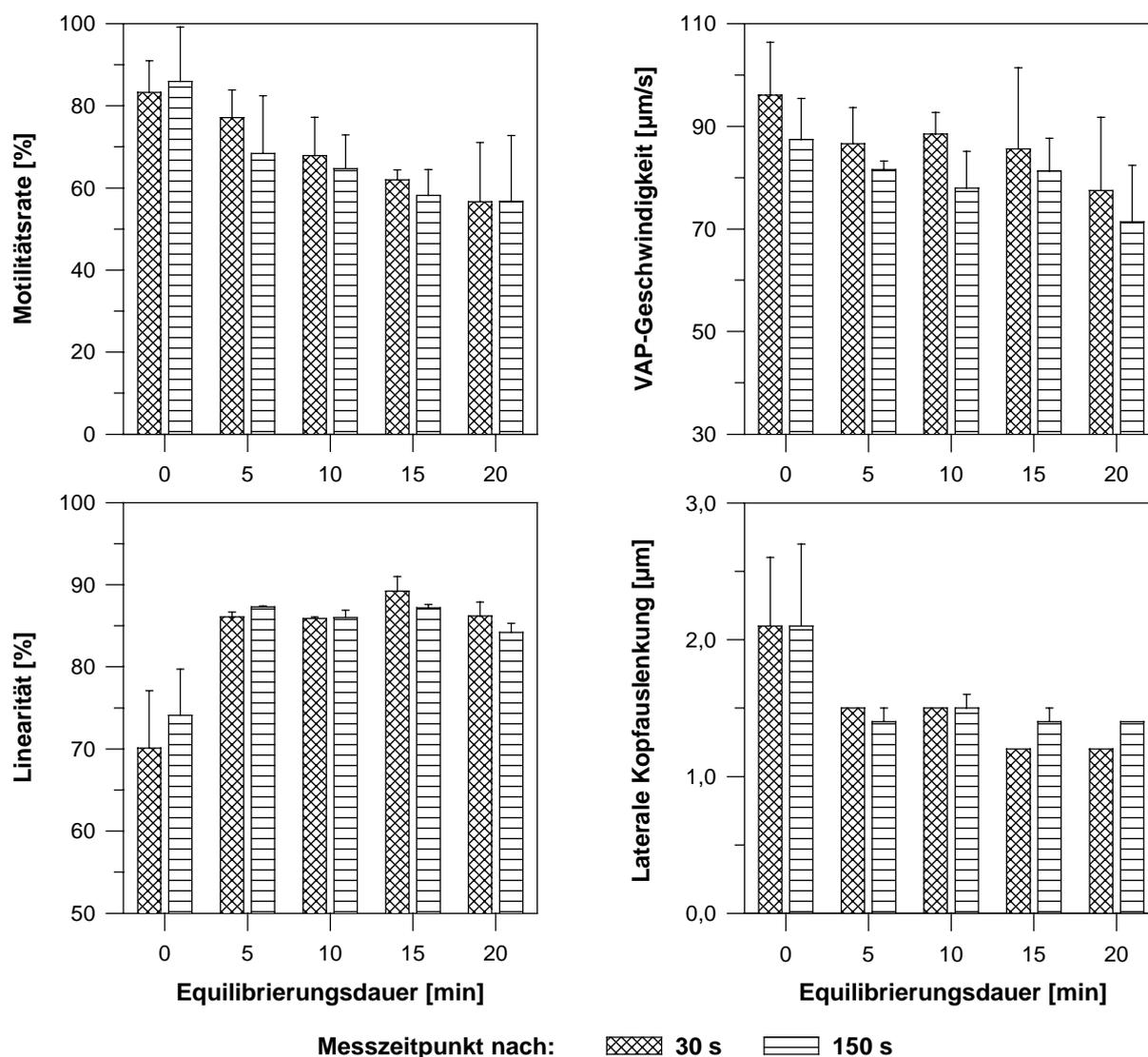
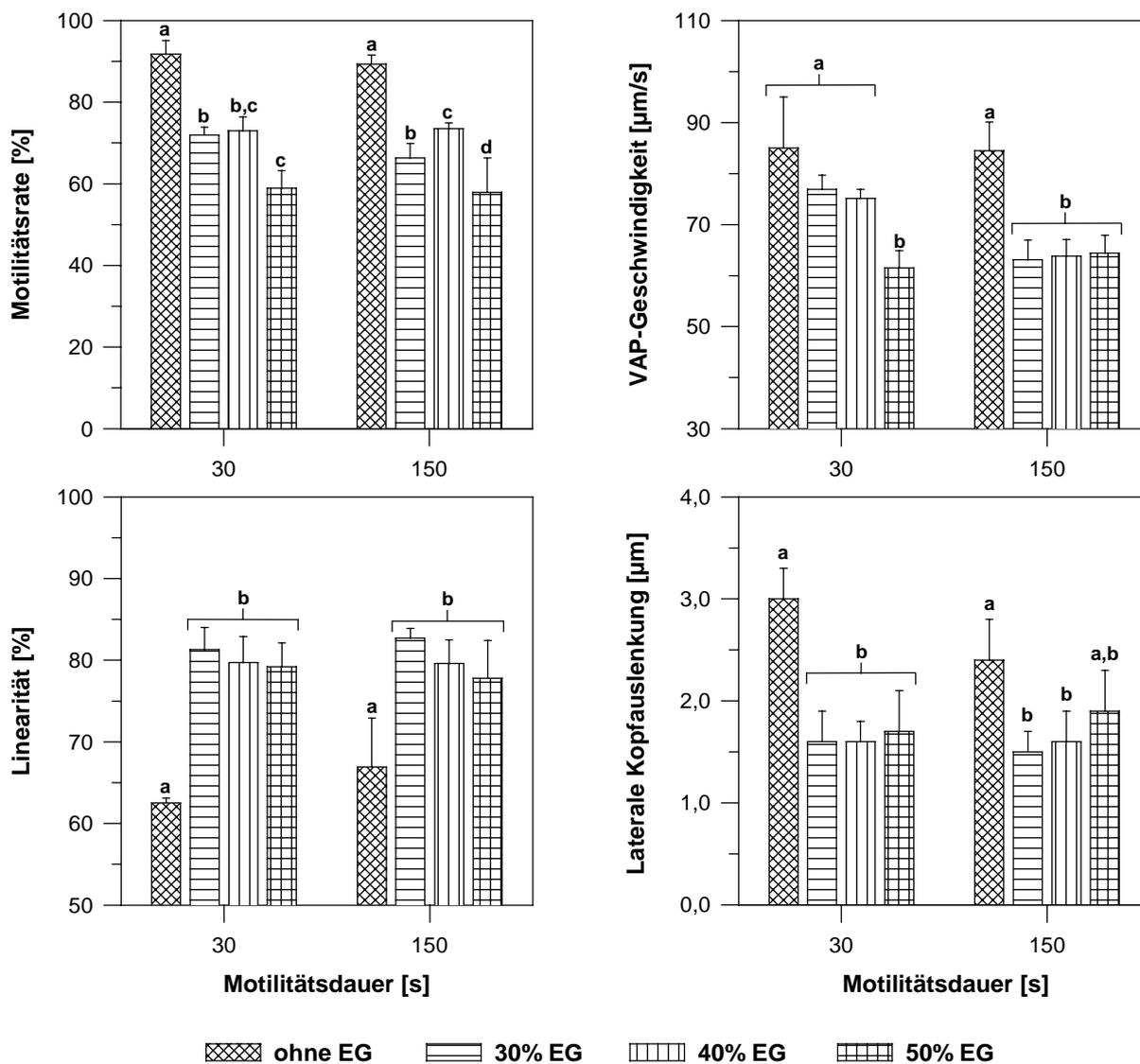


Abbildung 13: Motilitätseigenschaften von frischen Sterletspermien in Abhängigkeit von der Equilibrierungsdauer mit 35% EG (KryoE)

3.1.3.2 Variation der Kryomittelkonzentration

Die durchschnittlich etwa 15-minütige Equilibrierung von Sterletsperma mit den Kryomitteln KryoB, C und D (Mischung 1:2 = 1 Teil Sperma + 1 Teil Kryomittel) zeigte, dass eine Endkonzentration von 15–20% einer höheren Konzentrationen vorzuziehen ist (Abbildung 14). Zu Beginn der Bewegungsphase war die Motilitätsrate der mit 50%-EG-equilibrierten Probe gegenüber den anderen Konzentrationen signifikant erniedrigt. Im Vergleich zur frischen Probe reduzierte eine Inkubation mit 40% EG die Motilitätsrate am wenigsten. Signifikante Unterschiede traten beim Messzeitpunkt 150 s in der gleichen

Abstufung (frisch > 40% EG > 30% EG > 50% EG) auf. Die VAP-Werte wurden durch den Kontakt mit dem Kryomittel ebenfalls reduziert. Signifikante Unterschiede zur unbehandelten Probe gab es zu Beginn der Motilitätsphase bei 50% EG und nach 150 s bei allen drei equilibrierten Proben. Das gleiche gilt für die Parameter Linearität und LHD während der gesamten Motilitätsphase.



a,b,c,d = verschiedene Buchstaben bei einem Messzeitpunkt geben signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen (Konz. EG) an ($p < 0,05$)

Abbildung 14: Motilitätseigenschaften von frischen Sterletspermien nach 15-minütiger Equilibrierung mit 30–50% EG (Kryo B–D)

3.1.4 Kryokonservierbarkeit

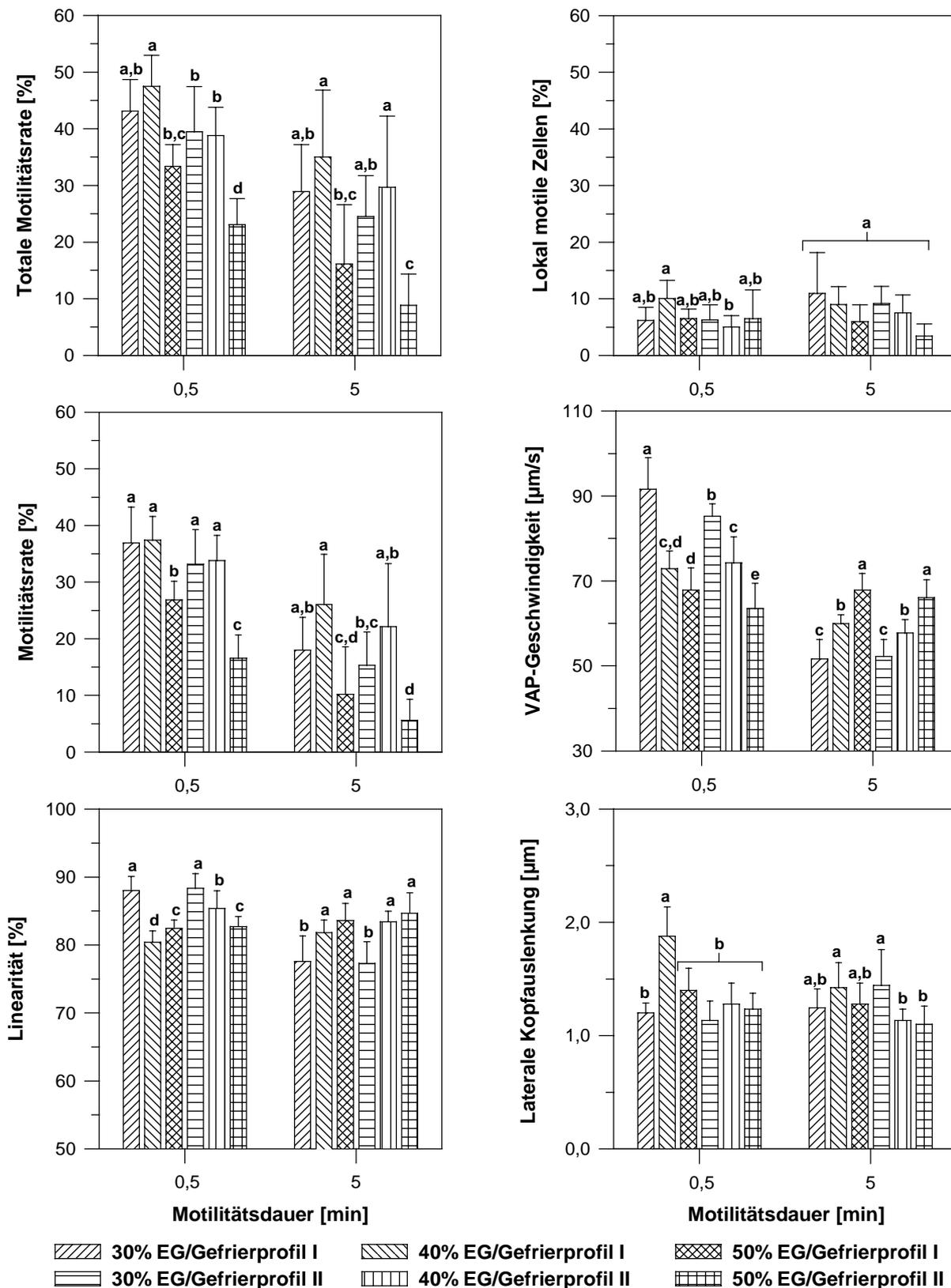
3.1.4.1 *Sterletspermien*

In Abbildung 15 sind die Motilitätseigenschaften der oben beschriebenen nativen bzw. equilibrierten Sterletspermien nach dem Auftauen dargestellt (vgl. Abbildung 14). Zwei verschiedene Gefrierprofile kamen hier zum Einsatz. Die durchschnittliche Motilitätsrate (Messzeitpunkt: 30 s), die durch die Equilibrierung mit den Kryomitteln schon von ca. 90% auf ca. 70% gesunken war, reduzierte sich im günstigsten Fall noch einmal um etwa die Hälfte auf ca. 35%. Unter Berücksichtigung der lokal motilen Zellen erreichte die Totale Motilitätsrate im günstigsten Fall immerhin fast 50%. Eine Ethylenglycol (EG) - Endkonzentration von 15 bzw. 20% (KryoB und KryoC) erwies sich als signifikant besser im Vergleich zu 25% EG (KryoD), unabhängig vom gewählten Einfrierprofil. Eine Motilitätsdauer von 5 min konnte mit allen sechs Varianten erreicht werden. Signifikante Unterschiede in der Motilitätsrate zum Messzeitpunkt 5 min traten vor allem bei 20% EG auf, welches mit beiden Profilen deutlich höhere Werte produzierte als die anderen EG - Konzentrationen.

Die höchsten VAP-Geschwindigkeitswerte wurden 30 s nach Aktivierung mit 15% EG gemessen, wobei Profil I mit durchschnittlich etwa 90 $\mu\text{m/s}$ signifikant höhere Werte hervorrief als alle anderen Varianten und sogar höher lag als die frische, unbehandelte Probe. 25% EG schnitt auch hier am schlechtesten ab, erzielte jedoch am Ende der Motilitätsphase (5 min) mit beiden Profilen signifikant höhere Geschwindigkeiten als die anderen Konzentrationen. Bei diesem Messzeitpunkt waren die VAP-Werte für 20% EG ihrerseits besser als die für 15% EG, was zum Zeitpunkt 30 s noch umgekehrt war. Die VAP-Werte lagen insgesamt im Bereich der Werte für die equilibrierten, nicht-konservierten Proben (vgl. Abbildung 14).

Beim Parameter Linearität wurden zu Beginn der Motilitätsphase unabhängig vom Profil signifikant höhere Werte durch das Einfrieren mit 15% EG hervorgerufen. Mit Werten von durchschnittlich fast 90% wurden damit auch deutlich höhere Ergebnisse erreicht als mit den equilibrierten Spermien und sogar um ca. 25 Prozentpunkte höhere Werte als mit der unbehandelten Probe. Im Vergleich der Gefrierprofile wurden besonders mit 20% EG deutlich (signifikant) höhere Linearitätswerte durch Profil II produziert. Im Gegensatz zum Messzeitpunkt 30 s lagen die Werte für 15% EG am Ende der Motilitätsphase signifikant niedriger als bei den anderen Behandlungen.

Der Parameter laterale Kopfauslenkung wies zu Beginn der Motilitätsphase in einem Fall ein signifikantes Ergebnis auf: 30 s nach Aktivierung lagen die Werte der Spermien, die mit 20% EG und Profil I eingefroren worden waren, um ca. 0,5 μm höher als bei den anderen Varianten. Am Ende der Motilitätsphase führte neben dieser Variante auch die Kombination 15% EG/Profil II zu signifikant höheren Werten als 20 und 25% EG jeweils in Verbindung mit Profil II.

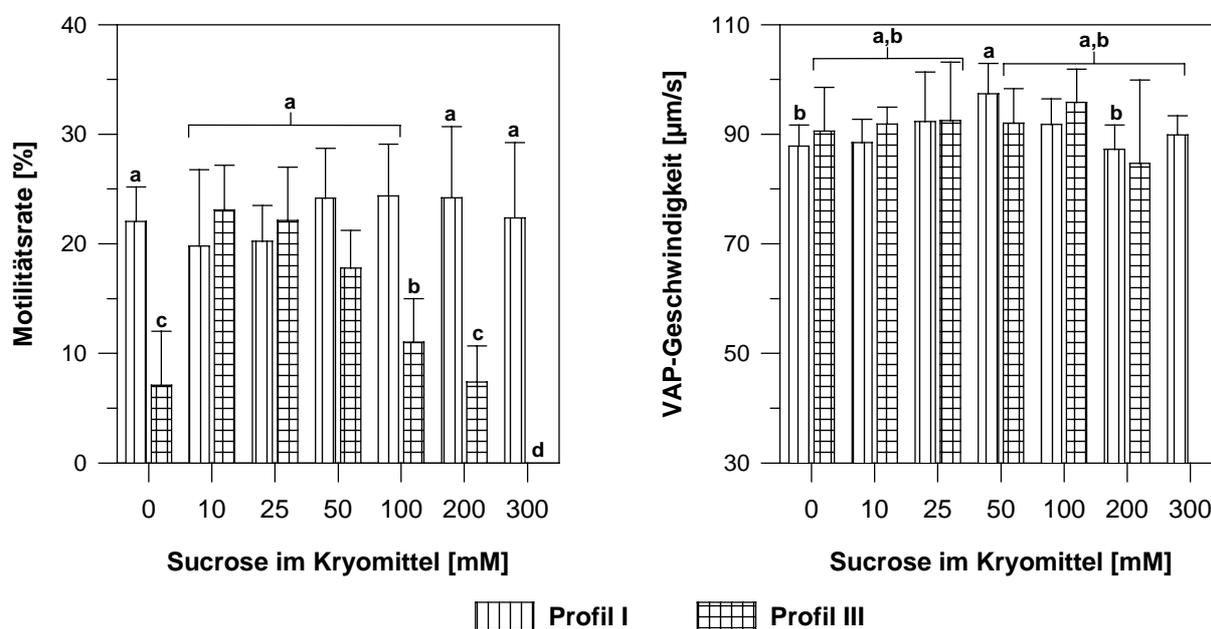


a,b,c,d,e = verschiedene Buchstaben bei einem Messzeitpunkt geben signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen (Konz. EG/Gefrierprofil) an ($p < 0,05$)

Abbildung 15: Motilitätseigenschaften von aufgetauten Sterletspermien nach dem Einfrieren mit 30–50% EG (Kryo B–D; Profil I und II)

3.1.4.1.1 Auftauprofile

Bei den Auftauversuchen stellte sich heraus, dass die eingefrorene Variante (KryoF) nach dem Auftauen nur geringe Motilitätsraten von unter 10% lieferte (o. Abbildung). Dennoch wurde deutlich, dass die mit etwa 20°C/min langsamste getestete Auftaugeschwindigkeit am wenigsten zum Auftauen der kryokonservierten Sterletspermien geeignet ist. Gegenüber 100°C/min (ca.) und 1320°C/min (ca.) erzielte diese Variante signifikant schlechtere Motilitätsraten. Tendenziell zeigten die Auftauraten 100°C/min (2 min bei 10°C) und 1320°C/min (10 s bei 20°C) bessere Motilitätswerte als noch höhere Auftaugeschwindigkeiten. Die VAP-Ergebnisse ergaben ein ähnliches Bild. Linearität und Kopfauslenkung waren relativ unbeeinflusst durch die verschiedenen Auftaugeschwindigkeiten.



a,b,c,d = verschiedene Buchstaben geben signifikante Unterschiede zum Messzeitpunkt 30 s zwischen allen Behandlungen (Sucrose-Konz./Gefrierprofil) an ($p < 0,05$)

Abbildung 16: Motilitätseigenschaften zum Zeitpunkt 30 s von aufgetauten Sterletspermien nach dem Einfrieren mit 40% EG (KryoC) und Sucrose in verschiedenen Konzentrationen (Profil I und III)

3.1.4.1.2 Sucrose-Zusatz

Der Zusatz von Sucrose zum Kryomittel (KryoC) in Konzentrationen von 10–300 mM (Endkonzentration: 5–150 mM) zeigte besonders unter Verwendung von Gefrierprofil III einen konzentrationsabhängigen Effekt auf die Motilität der aufgetauten Sterletspermien (Abbildung 16). Geringe Sucrose-Zusätze in Konzentrationen von 10–50 mM erhöhten die Motilitätsrate der mit Profil III

eingefrorenen Spermien signifikant gegenüber höheren Sucrose-Konzentrationen bzw. keinem Sucrose-Zusatz. In Kombination mit diesem Gefrierprofil erzielte die Konzentration 10 mM die höchsten Motilitätsraten (zu Beginn der Bewegungsphase). Mit Profil I ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Motilitätsrate in bezug auf die Sucrose-Konzentration. Die tendenziell höchsten Motilitätsraten nach dem Einfrieren mit Profil I wurden mit Konzentrationen von 50–200 mM (Endkonzentration: 25–100 mM) erreicht. 50 mM Sucrose in Kombination mit Profil I erzielte signifikant höhere VAP-Geschwindigkeiten als 0 und 200 mM Sucrose in Verbindung mit Profil I. Die VAP-Werte aller anderen Varianten waren nicht signifikant verschieden. Die LHD- und Linearitätswerte waren bei allen Varianten ebenfalls auf einem gleichen Niveau (o. Abbildung).

3.1.4.2 Karpfenspermien

Karpfenspermaproben waren in allen Fällen im Verhältnis 1:6 (1 Teil Sperma + 5 Teile Kryomittel) eingefroren worden. Nach dem Auftauen erreichten die höchsten gemessenen Mittelwerte für die Totale Motilitätsrate der Karpfenspermien etwa 40%. Der Anteil an lokal motilen Zellen betrug dabei ca. 15%. Der Zusatz von Sucrose (bzw. Trehalose, s.u.) zum Kryomittel (DMA in Verbindung mit dem Verdüner MK2) führte auch bei Karpfenspermien zu einer Erhöhung der Motilitätsrate der aufgetauten Zellen (Abbildung 17). Besonders die Varianten, denen 200 mM Sucrose (Kryo3) zugesetzt worden war und die mit Gefrierprofil I bzw. III eingefroren worden waren, erzielten deutlich höhere Motilitätswerte als die Varianten, die keine Sucrose enthielten. Die Geschwindigkeiten der aufgetauten Spermien erhöhten sich leicht mit steigender Sucrose-Konzentration. Die höchsten VAP-Werte wurden mit 300 mM Sucrose (Kryo4) und Profil III erreicht. Im Vergleich der Gefrierprofile erwies sich Profil II unabhängig von der Sucrose-Konzentration als insgesamt weniger geeignet.

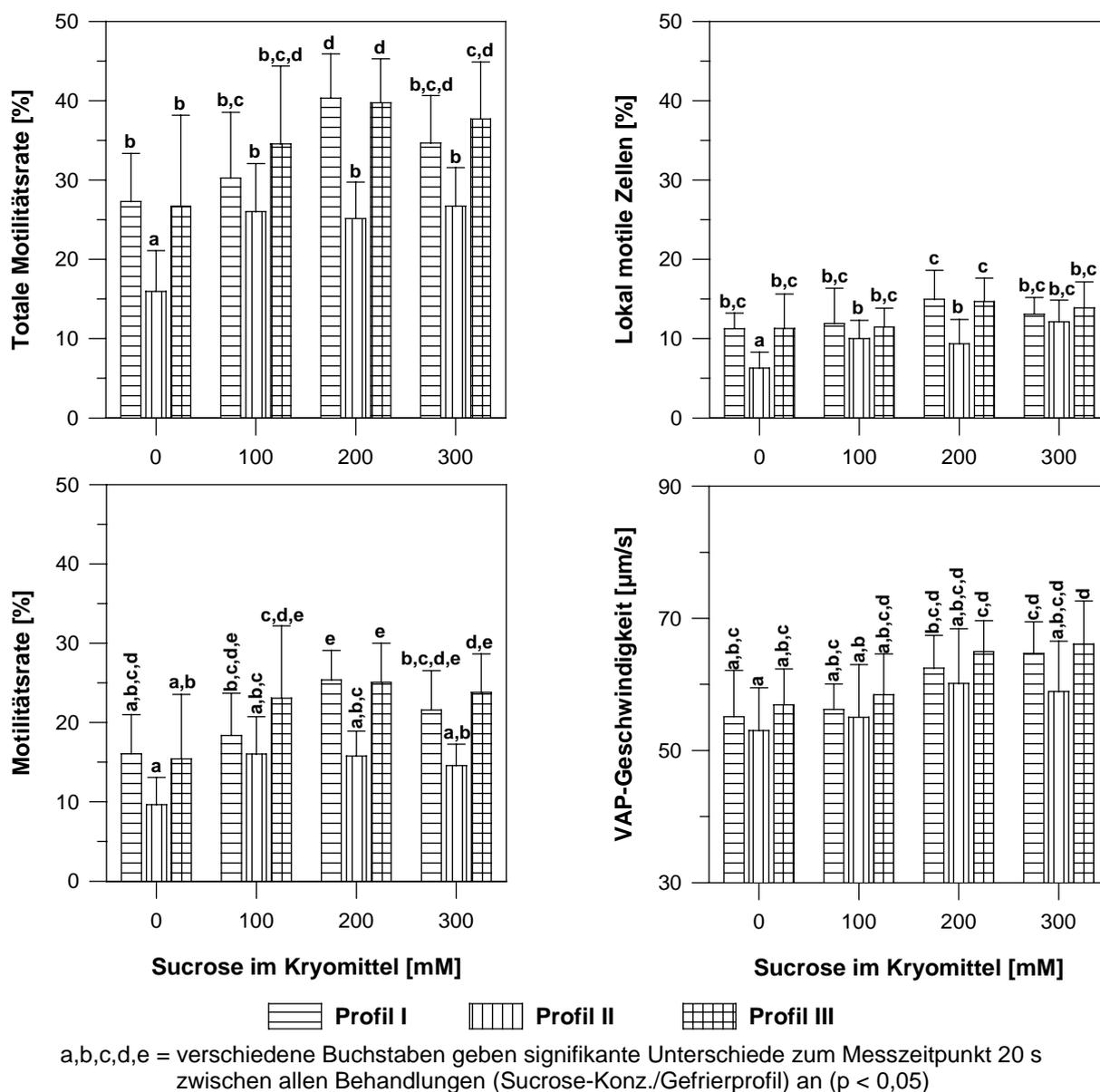


Abbildung 17: Motilitätseigenschaften zum Zeitpunkt 20 s von aufgetauten Karpfenspermien nach dem Einfrieren mit 15% DMA/MK2 und Sucrose in verschiedenen Konzentrationen (Kryo1–4; Profil, I, II und III)

Der Vergleich der Verdüner Immo1 und MK2 (mit 200 mM Trehalose) bei DMA-Konzentrationen von 15–25% ergab eine bessere Eignung des komplexeren Verdüners (Abbildung 18). Insgesamt war der Anteil an beweglichen Zellen höher, wenn die Spermien mit dem MK2/Trehalose-Verdünner kryokonserviert worden waren. DMA-Konzentrationen von 15% (Kryo9) bzw. 20% (Kryo10) sind dabei höheren Konzentrationen vorzuziehen. In Verbindung mit MK2 konnten mit diesen beiden DMA-

Konzentrationen signifikant höhere Motilitätsraten erzielt werden als mit den anderen Varianten. Der Anteil an lokal motilen Zellen war bei 25% DMA (Kryo11) etwas höher als bei 15 und 20% DMA. Die höchsten totalen Motilitätsraten wurden mit 20% DMA in Verbindung mit MK2/200 mM Trehalose (Kryo10) erzielt. Die VAP-Geschwindigkeit war bei 15% DMA unabhängig vom Verdünner am höchsten und gegenüber 25% DMA statistisch signifikant größer.

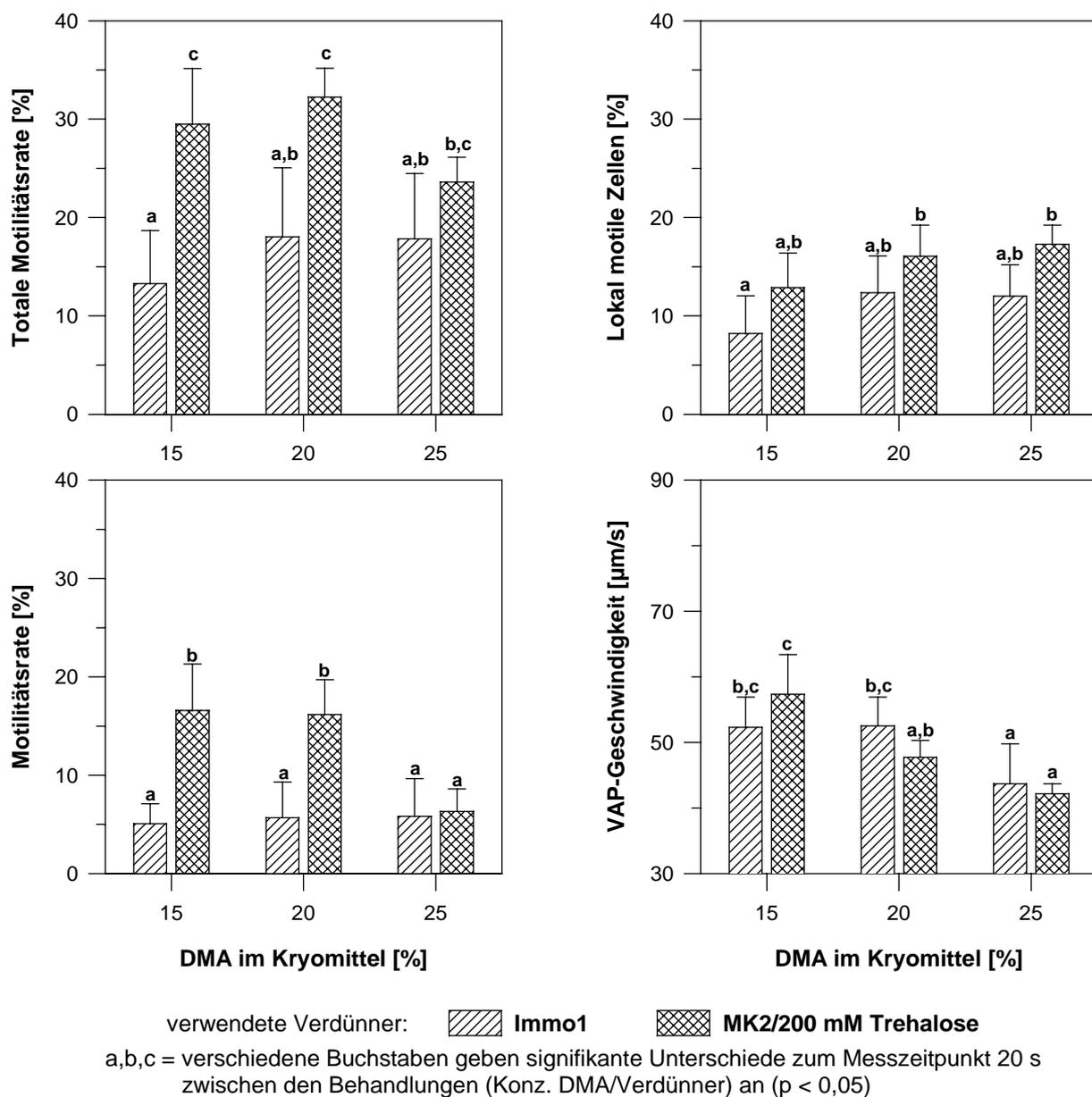


Abbildung 18: Motilitätseigenschaften zum Zeitpunkt 20 s von aufgetauten Karpfenspermien nach dem Einfrieren mit 15–25% DMA und den Verdünnern Immo1 (Kryo6–8) bzw. MK2/200 mM Trehalose (Kryo9–11; alle Profil III)

Abbildung 19 zeigt die Ergebnisse aus dem Vergleich der beiden erfolgreichsten Kryomittel Kryo3 und Kryo10, die sich lediglich in der DMA-Konzentration (15 oder 20%) sowie in der Art des Zuckerzusatzes (Sucrose oder Trehalose) unterscheiden. Unabhängig vom Gefrierprofil (I oder III) erzielte das Einfrieren mit Kryo10 höhere Motilitätsraten als das Einfrieren mit Kryo3. Signifikante Unterschiede wurden jedoch nur unter Berücksichtigung aller beweglichen Zellen (Totale Motilitätsrate) zwischen Kryo3/Profil I und Kryo10/Profil III festgestellt.

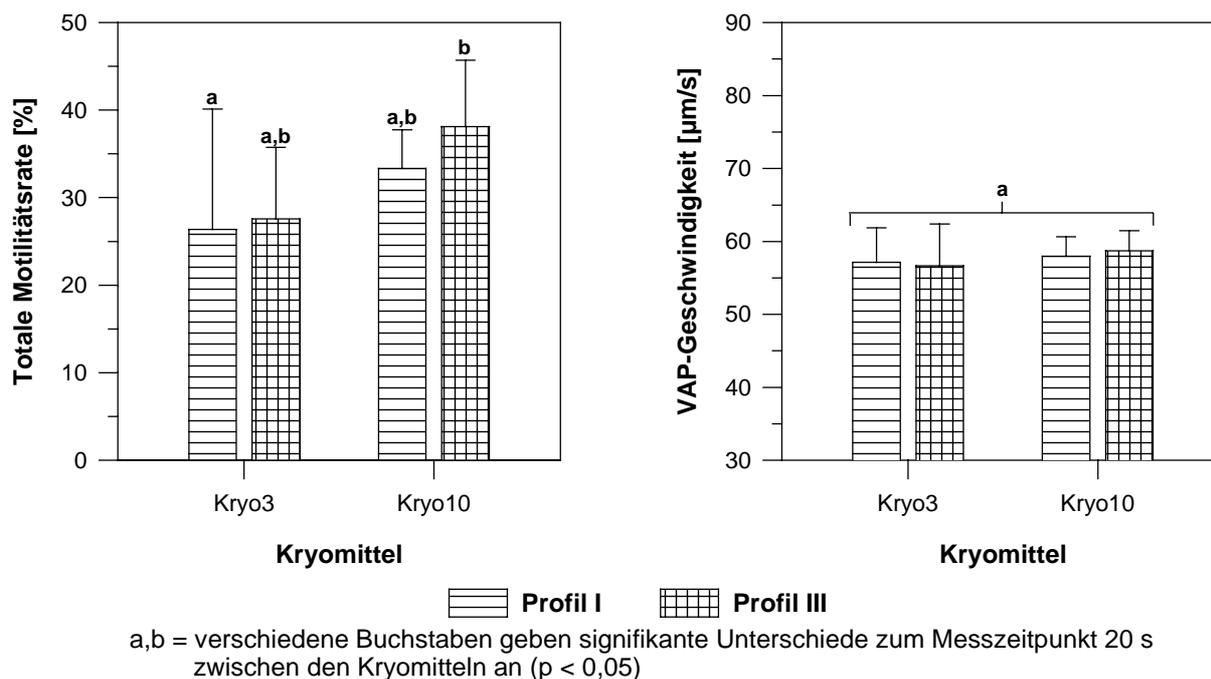


Abbildung 19: Motilitätseigenschaften zum Zeitpunkt 20 s von aufgetauten Karpfenspermien nach dem Einfrieren mit Kryo3 (15% DMA/MK2/200 mM Sucrose) und Kryo10 (20% DMA/MK2/200 mM Trehalose) (Profil I und III)

3.1.4.3 Vergleich der Motilitätseigenschaften mit nativen Proben

In Tabelle 10 sind die Motilitätseigenschaften von Karpfen- bzw. Sterletpermien aufgeführt, die mit der jeweils erfolgreichsten Methode (Kryomittel, Gefrierprofil) eingefroren worden waren. Bei beiden Arten sind durch den Einfrier- und Auftauprozess im Vergleich zur frischen Probe etwa 50 Prozentpunkte an motilen Zellen verloren gegangen. Die Zusammensetzung der Klasse der motilen Zellen hat sich ebenfalls verändert: Der Prozentsatz der linear motilen Zellen (LM) erhöhte sich bei beiden Arten zu Beginn der Motilitätsphase, der Anteil Nicht-linear Motiler (NLM) reduzierte sich dafür. Bei aufgetauten Sterletpermien bestand die Klasse der motilen Zellen sogar während der gesamten Motilitätsphase zu über 80% aus LM (vor dem Einfrieren durchschnittlich etwa 55%). Der Prozentsatz der hyperaktiven

Zellen hatte sich durch das Einfrieren und Auftauen bei beiden Arten nur unwesentlich verändert. In die Unterklasse der Kreisläufer wurden nach dem Auftauen weder Karpfen- noch Sterletspermien eingestuft. Der Anteil an lokal motilen Zellen zu Beginn der jeweiligen Motilitätsphase hatte sich bei beiden Arten nur wenig verändert, jedoch war im Gegensatz zu den nativen Proben nur ein geringer Anstieg dieses Parameters mit dem Verlauf der Motilitätsphase zu verzeichnen.

Aufgrund der relativ großen Schwankungen in der lateralen Kopfauslenkung (LHD) der aufgetauten Karpfenspermien waren Unterschiede zu den frischen Proben nicht eindeutig feststellbar. Die LHD der aufgetauten Sterletspermien war im Vergleich zur frischen Probe etwas reduziert und sank im Verlauf der Motilitätsphase auf durchschnittlich $1,4 \mu\text{m}$ nach 5 min. Die Linearität der Spermien war zu Beginn der jeweiligen Motilitätsphase bei beiden Arten nach dem Auftauen im Vergleich zu unbehandelten Proben erhöht. Aufgetaute Sterletspermien blieben während der gesamten Motilitätsphase auf diesem erhöhten Niveau. Bei Karpfenspermien sank die Linearität nach 40 s unter den Durchschnittswert der nativen Probe zu diesem Messzeitpunkt.

Die Geschwindigkeiten (VCL, VAP und VSL) der motilen Zellen zu Beginn der Motilitätsphase waren bei beiden Arten im Vergleich zur jeweils frischen Probe um ca. 20% reduziert. Dies galt auch für die Unterklassen LM und NLM. Jedoch bereits nach 40 s bei Karpfen- bzw. 3 min bei Sterletspermien waren kaum Unterschiede in den Geschwindigkeitswerten zwischen nativen und aufgetauten Spermien festzustellen. Dies galt nicht für die Geschwindigkeit der als hyperaktiv klassifizierten Zellen. Ihre Geschwindigkeit hatte sich bei beiden Arten im Vergleich zur frischen Probe tendenziell erhöht und erreichte bei den VCL-Werten die jeweils höchsten gemessenen Geschwindigkeiten.

Tabelle 10: Motilitätseigenschaften von aufgetauten Karpfen- und Sterletspermien

Messzeitpunkte:	Karpfen			Sterlet		
	20 s	30 s	40 s	1 min	3 min	5 min
Zellkonz. [$\cdot 10^9$ /ml]	16,4 \pm 2,5	15,9 \pm 2,8	15,4 \pm 3,1	1,3 \pm 0,1	1,3 \pm 0,2	1,3 \pm 0,2
Totale Motilität [TM, %]	38,1 \pm 7,6	31,7 \pm 6,7	28,2 \pm 5,8	45,1 \pm 5,2	42,5 \pm 7,2	35,0 \pm 11,8
Lokal Motile [LoM, %]	15,6 \pm 3,9	17,1 \pm 4,4	20,8 \pm 4,7	8,5 \pm 2,5	8,4 \pm 2,9	9,0 \pm 3,2
LHD [μ m]	0,9 \pm 0,2	1,1 \pm 0,8	1,2 \pm 0,9	1,9 \pm 0,3	1,6 \pm 0,2	1,4 \pm 0,2
Linearität [%]	79,7 \pm 4,2	80,7 \pm 6,9	75,4 \pm 9,9	81,2 \pm 3,0	82,6 \pm 2,9	81,8 \pm 1,8
Motile [M, %]	22,5 \pm 4,7	14,6 \pm 3,0	7,3 \pm 2,4	36,6 \pm 4,0	34,1 \pm 4,9	26,1 \pm 8,9
VCL M [μ m/s]	66,1 \pm 2,6	58,2 \pm 6,8	54,5 \pm 8,7	91,0 \pm 2,9	84,9 \pm 2,2	70,1 \pm 1,9
VAP M [μ m/s]	58,7 \pm 2,8	48,7 \pm 3,4	42,7 \pm 1,6	77,4 \pm 4,5	73,7 \pm 3,2	59,9 \pm 2,1
VSL M [μ m/s]	50,1 \pm 3,9	42,5 \pm 4,6	35,8 \pm 3,9	72,1 \pm 5,4	68,9 \pm 3,8	56,1 \pm 2,7
Linear M [LM, %]	61,5 \pm 9,7	67,9 \pm 11,8	63,1 \pm 18,6	81,7 \pm 7,2	85,4 \pm 5,4	85,7 \pm 5,0
VCL LM [μ m/s]	65,6 \pm 2,6	53,6 \pm 3,1	49,9 \pm 5,7	91,2 \pm 3,3	84,5 \pm 2,3	70,4 \pm 2,3
VAP LM [μ m/s]	61,6 \pm 3,0	48,8 \pm 3,7	43,0 \pm 2,0	80,7 \pm 4,0	75,5 \pm 2,8	61,9 \pm 2,3
VSL LM [μ m/s]	59,5 \pm 3,0	47,2 \pm 3,7	41,6 \pm 2,1	78,6 \pm 3,9	73,4 \pm 2,9	59,9 \pm 2,3
Nicht-LM [NLM, %]	38,4 \pm 9,8	30,8 \pm 8,7	34,9 \pm 15,1	17,2 \pm 6,6	14,0 \pm 5,0	13,9 \pm 4,7
VCL NLM [μ m/s]	67,6 \pm 5,4	64,0 \pm 6,2	58,7 \pm 6,2	84,1 \pm 5,2	84,1 \pm 6,8	63,7 \pm 8,3
VAP NLM [μ m/s]	54,6 \pm 4,0	47,4 \pm 4,8	42,1 \pm 4,6	62,4 \pm 4,0	63,3 \pm 5,4	46,4 \pm 4,7
VSL NLM [μ m/s]	36,0 \pm 4,3	32,8 \pm 4,3	26,4 \pm 4,0	43,6 \pm 4,4	42,5 \pm 3,7	32,3 \pm 4,8
Hyperaktive [H, %]	0,2 \pm 0,4	1,3 \pm 3,9	2,0 \pm 4,9	1,1 \pm 1,1	0,7 \pm 0,6	0,5 \pm 0,8
VCL H [μ m/s]	87,8 \pm 8,7	144,8	123,5 \pm 14,5	163,6 \pm 35,4	125,3 \pm 18,9	130,4 \pm 1,0
VAP H [μ m/s]	49,7 \pm 8,4	49,3	49,6 \pm 7,1	61,6 \pm 23,7	58,8 \pm 12,8	63,0 \pm 4,6
VSL H [μ m/s]	19,7 \pm 10,5	29,1	28,3 \pm 10,1	49,0 \pm 24,0	38,4 \pm 16,9	40,2 \pm 12,6
Kreisläufer [KL, %]	0	0	0	0	0	0

Karpfen: Einzelprobe; 1:6 Kryo10; Profil III; ca. 1 Monat kryokons.; Initiation 1:2 ImmoS + 1:5 Ini4Ca; Messtemperatur: ca. 13°C; Messung 1–5 min nach dem Auftauen (n = 9: 3 Straws à 3 Replikate)

Sterlet: Einzelprobe; 1:2 KryoC; Profil I; ca. 8 Monate kryokons.; Initiation 1:3 IniCa; Messtemperatur: ca. 9°C; Messung 1–15 min nach dem Auftauen (n = 9: 3 Straws à 3 Replikate)

3.1.5 Befruchtungsfähigkeit

Befruchtungsversuche wurden durchgeführt, um zu überprüfen, ob die mit den beschriebenen Methoden kryokonservierten Spermien nach dem Auftauen in der Lage sind, frische Eier zu befruchten und wie groß der Unterschied zur Kontrolle mit frischen Spermien ist.

3.1.5.1 Karpfenspermien

In allen fünf Ansätzen wurden die Eier erfolgreich befruchtet (Befruchtungsraten von 95–99%) (Tabelle 11). Während der Embryonalentwicklung wurden Unterschiede zwischen den Ansätzen bzw. den eingesetzten Spermaproben offenbar. Die besten Ergebnisse konnten mit nativen (Kontrolle) und mit den für sechs Tage konservierten Spermien aus Ansatz 3 (Kryo10) erzielt werden. In beiden Ansätzen schlüpften etwa 80% der Embryos. Fast ebenso viele dieser Embryos entwickelten sich dann auch zu schwimmfähigen Larven. Um etwa 10 Prozentpunkte schlechter waren die Ergebnisse aus Ansatz 2, dessen Spermien mit dem Kryomittel equilibriert worden waren und einen Großteil an Motilität (ca. 45 Prozentpunkte) eingebüßt hatten. Signifikant geringere Schlupfraten sowie Anzahlen schwimmfähiger Larven wurden in den Ansätzen 4 und 5 beobachtet. Sowohl das aufgetaute und anschließend gewaschene Sperma als auch die mit Kryo3 konservierten Spermien produzierten ungefähr 60% an toten bzw. fehlentwickelten Embryos. Dennoch entwickelten sich etwa 40% der Eier zu schwimmfähigen Larven, was besonders für Ansatz 5 wegen der langen Lagerungszeit erwähnenswert ist.

Tabelle 11: Bedingungen und Ergebnisse aus den Befruchtungsversuchen mit Karpfensperma

Ansatz Nr.:	1	2	3	4	5
Spermaqualität	frisch	frisch/equil.	kryok.	kryok./gew.*	kryok.
Kryomittel	-	Kryo10	Kryo10	Kryo10	Kryo3
Equilibrierdauer [min]	-	5	5	5	5
Gefrierprofil	-	III	III	III	III
Lagerungsdauer [d]	-	-	6	6	349
Motilitätsrate [%]¹	62±13 ^a	17±4 ^{b,c}	23±3 ^b	8±3 ^c	25±2 ^b
VAP [µm/s]¹	58±2 ^b	54±5 ^{b,c}	59±1 ^b	52±3 ^c	65±1 ^a
Befruchtungsrate [%]²	99	95	98	95	99
Schlupfrate [%]³	80±2 ^a	69±7 ^a	80±2 ^a	44±6 ^b	41±4 ^b
Schwimmfähige Larven [%]³	79±2 ^a	68±7 ^a	78±2 ^a	43±6 ^b	38±5 ^b

* Kryokonservierte, aufgetaute und anschließend gewaschene Probe: 100 µl der aufgetauten Spermien wurde mit 400 µl ImmoF versetzt und für 3 min bei 700g und 2°C abzentrifugiert; der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 200 µl ImmoF resuspendiert; die Zellkonzentration wurde bestimmt, mit ImmoF auf $1.0 \cdot 10^8$ Spz/ml eingestellt und so in den Befruchtungsversuchen eingesetzt

¹ bestimmt 20 s nach Aktivierung

² bestimmt in einem der drei Replikate 4–6 h nach der Befruchtung

³ Prozentsatz bezieht sich auf die Gesamtzahl der pro Ansatz eingesetzten Eier

a,b,c = verschiedene Buchstaben in einer Reihe geben signifikante Unterschiede zwischen den Ansätzen an ($p < 0.05$)

3.1.5.2 Sterletspermien

Unabhängig von der eingesetzten Spermiedichte ($1 \cdot 10^3$ oder $1 \cdot 10^6$ Spz/Ei) lagen die Befruchtungsrate und die Rate der normal entwickelten Embryonen in den Ansätzen mit frischen, unbehandelten Spermien (Ansatz 1 und 2) über 90% (Tabelle 12). Die mit dem Kryomittel KryoC equilibrierte Probe (Ansatz 3) erreichte um etwa 10–20 Prozentpunkte geringere Werte, was mit einer vergleichbaren Reduzierung der Motilitätsrate nach der Equilibrierung einher geht. Die Befruchtungsrate und die Rate der normal entwickelten Embryos bei den Ansätzen mit kryokonservierten/aufgetauten Proben erreichten ebenfalls Werte über 70%, obwohl die Motilitätsraten deutlich geringer waren. Die Lagerungszeit (1 Tag oder fast 1 Jahr) und die Art des Kryomittels (KryoC oder KryoF) spielten offenbar auch keine entscheidende Rolle beim Befruchtungserfolg.

Tabelle 12: Bedingungen und Ergebnisse aus den Befruchtungsversuchen mit Sterletsperma

Ansatz Nr.:	1	2	3	4	5
Spermaqualität	frisch	frisch	frisch/equil.	kryok.	kryok.
Kryomittel	-	-	KryoC	KryoC	KryoF
Equilibrierdauer [min]	-	-	15	15	15
Gefrierprofil	-	-	-	I	II
Lagerungsdauer [d]	-	-	-	1	355
Spermienanzahl/Ei [n]	$1 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^6$
Motilitätsrate [%] ¹	87±3	87±3	70±4	28±7	10±2
VAP [µm/s] ¹	93±4	93±4	74±2	79±2	81±4
Befruchtungsrate [%] ^{2,4}	91	94	78	76	73
Normale Embryonen [%] ^{3,4}	90	90	73	71	70

¹ bestimmt 60 s nach Aktivierung

² bestimmt innerhalb von 24 h nach der Befruchtung

³ bestimmt innerhalb von 3 d nach der Befruchtung

⁴ Prozentsatz bezieht sich auf die Gesamtzahl der pro Ansatz eingesetzten Eier