

## 5.1 Zusammenfassung

### Sybil Leopold : Faktoren, die den Kalzium-Flux equiner Spermatozoen beeinflussen

Die Durchlässigkeit der Spermienmembran für Kalzium verändert sich während Kapazitation und Akrosomreaktion dramatisch. Diese Prozesse finden unmittelbar vor der Fertilisation im Eileiter des weiblichen Genitaltraktes statt.

Der Kalziumtransport ist für Pferdespermien bisher noch nicht beschrieben worden. Es kann angenommen werden, daß andere Vorgänge, die in engem Zusammenhang mit der Fertilisation stehen, von den Sekretionsprodukten des Eileiters beeinflußt werden.

Tiefgefrierung beeinträchtigt unter Umständen die regulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportsysteme und ist eine mögliche Ursache für die Reduktion der Befruchtungskapazität von Tiefgefriersperma.

In dieser Studie wurde  $\text{Ca}^{2+}$ -Flux von frischem und tiefgefrorenem Hengstsperma in einfachem und Ovidukt-Epithelzell-konditioniertem Medium (OCM) untersucht. Die Hypothese war, daß die Sekretionsprodukte des Eileiters und Tiefgefrieren des Spermas den  $\text{Ca}^{2+}$ -Flux beeinflussen.

Um Informationen über den regulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Flux in der equinen Samenzelle zu gewinnen, wurde Frisch- und Tiefgefriersperma von zwei fruchtbaren Ponyhengsten untersucht. Frisches und tiefgefrorenes Sperma wurde in  $\text{Ca}^{2+}$ -freier PBS gewaschen und sein Gehalt an intrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Ca}^{2+}_i$ ) und extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Ca}^{2+}_e$ ) mit dem Fluoreszenzfarbstoff Indo-1 festgestellt. Die statistische Auswertung der Ergebnisse zeigte, daß während der ersten 30 Minuten der Fluoreszenzmessung der  $\text{Ca}^{2+}_i$ -Gehalt in Tiefgefriersperma größer als der in Frischsperma war ( $P \leq 0.0001$ ). Der  $\text{Ca}^{2+}_e$ -Gehalt in frischem Sperma war größer als in tiefgefrorenem ( $P \leq 0.0039$ ). Nach 30 Minuten wurde 1mM  $\text{Ca}^{2+}$  oder Wasser (Kontrollproben) hinzugefügt und der  $\text{Ca}^{2+}_i$ -Gehalt eine Minute lang im Abstand von 0.1 Sekunden gemessen, um unmittelbare Auswirkungen zu

beobachten. Sowohl Frisch-, als auch Tiefgefriersperma nahmen exogenes Kalzium unmittelbar und schnell auf und erreichten ein Plateau in weniger als 5 Minuten. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahmerate von tiefgefrorenem Sperma unterschied sich nicht von der des frischen Spermas. Während der folgenden 30 Minuten erfolgte in beiden Spermientypen keine weitere Aufnahme von  $\text{Ca}^{2+}$ . Spermien, die exogenem Kalzium ausgesetzt waren, enthielten mehr  $\text{Ca}^{2+}$ , als die entsprechenden Kontrollproben ( $P \leq 0.0008$ ). Tiefgefriersperma hatte einen höheren  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt als Frischsperma sowohl nach Zuführung von exogenem Kalzium als auch in den Kontrollproben ( $P \leq 0.0008$ ). Es bestand ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Hengsten ( $P \leq 0.0118$ ). Die Ergebnisse der  $\text{Ca}^{2+}$ -Flux Messungen zeigten keine Korrelationen zu Akrosomintegrität und Motilität der Spermien.

Um den Einfluß von Eileitersekretionsprodukten auf den  $\text{Ca}^{2+}$ -Flux von Hengstspermien zu untersuchen, wurden Eileiterepithelzellen von nichttragenden Stuten gewonnen und in Zellkulturmedium M-199 inkubiert. Nach 48 Stunden Inkubation wurde das Ovidukt-Epithelzell-konditionierte Medium (OCM) zellfrei gewonnen. Frisch- und Tiefgefriersperma wurde in TCF gewaschen und 1 Stunde entweder in Zellkulturmedium M-199 oder in OCM inkubiert. Danach wurden beide Spermientypen in  $\text{Ca}^{2+}$ -freier PBS gewaschen und ihr  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt wie vorher festgestellt. Wiederum hatte Tiefgefriersperma einen höheren  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt als Frischsperma ( $P \leq 0.0001$ ) und frisches Sperma einen höheren  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt als tiefgefrorenes Sperma ( $P \leq 0.0001$ ). Spermien, die in OCM inkubiert wurden, nahmen  $\text{Ca}^{2+}$  schneller auf als Spermien, deren Inkubation in Zellkulturmedium M-199 erfolgte ( $P \leq 0.0073$ ). OCM beeinflusste den  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt von Frisch- und Tiefgefriersperma der beiden Hengste unterschiedlich ( $P \leq 0.0073$ ). Frischsperma nahm exogenes Kalzium schneller auf als Tiefgefriersperma ( $P \leq 0.0001$ ). Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt veränderte sich nicht während der Messzeit.

Sperma der beiden Hengste reagierte unterschiedlich auf Zugabe von exogenem  $\text{Ca}^{2+}$  abhängig vom Inkubationsmedium ( $P \leq 0.0001$ ). Tiefgefrieren blieb ein signifikanter Einflußfaktor ( $P \leq$

0.0001). Es bestanden positive Korrelationen zwischen Motilität der Spermien und deren  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt, sowie negative Korrelationen zwischen der Anzahl intakter Akrosome und dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt der Spermien.

Zusammenfassend bestehen zwar Unterschiede zwischen Hengsten, aber äußere Bedingungen und Sekretionsprodukte des Eileiters beeinflussen die  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme von Pferdespermien. Tiefgefrieren hat unabhängig von allen anderen Faktoren einen starken Einfluß auf alle Aspekte der  $\text{Ca}^{2+}$ -Kontrolle von equinen Samenzellen.

Calcium permeability of sperm membranes changes dramatically at the time of capacitation and the acrosome reaction, which are events that must occur in the oviduct immediately before fertilization. Calcium transport has not been characterized in equine sperm, but other events associated with fertilization have been suggested to be influenced by oviductal fluid. Cryopreservation may disrupt normal membrane  $\text{Ca}^{2+}$  transport systems perhaps causing some of the reduction of fertilizing capacity seen in cryopreserved spermatozoa. This study investigated  $\text{Ca}^{2+}$  flux in equine spermatozoa maintained in simple and oviductal-cell-conditioned media (OCM). It is hypothesized that OCM and cryopreservation affect  $\text{Ca}^{2+}$  flux.

To establish normal  $\text{Ca}^{2+}$  flux, fresh and cryopreserved spermatozoa from each of two pony stallions of proven fertility were analyzed. Fresh and cryopreserved spermatozoa were washed in  $\text{Ca}^{2+}$ -free PBS and intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Ca}^{2+}_i$ ) and extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Ca}^{2+}_e$ ) were determined with the fluorescent dye indo-1. Statistical analysis found that, over the initial 30 min,  $\text{Ca}^{2+}_i$  was higher in cryopreserved spermatozoa than in fresh ( $P \leq 0.0001$ ) and  $\text{Ca}^{2+}_e$  was higher in fresh than in cryopreserved spermatozoa ( $P \leq 0.0039$ ). At 30 min, exogenous 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  or water was added and  $\text{Ca}^{2+}$  was determined every 0.1 sec for 1 min to observe any immediate effects. Both fresh and cryopreserved spermatozoa took in exogenous  $\text{Ca}^{2+}$  immediately and rapidly, reaching a plateau in less than 5 minutes. The rate of  $\text{Ca}^{2+}$  internalization did not differ between fresh and cryopreserved spermatozoa. Over the next 30 min there was no further internalization of exogenous  $\text{Ca}^{2+}$  by either type of spermatozoa. The  $\text{Ca}^{2+}$ -exposed spermatozoa maintained higher  $\text{Ca}^{2+}_i$  than the controls ( $P \leq 0.0008$ ). Cryopreserved spermatozoa had higher  $\text{Ca}^{2+}_i$  than fresh in both controls and  $\text{Ca}^{2+}$ -exposed ( $P \leq 0.01$ ). There was a significant difference between stallions ( $P \leq 0.0188$ ). The  $\text{Ca}^{2+}$  flux data had no correlations to acrosome integrity and motility of the spermatozoa.

To evaluate the effect of oviductal environment on spermatozoa  $\text{Ca}^{2+}$  flux, oviductal epithelial cells from non-pregnant mares were incubated in tissue culture media M-199 for 48h. The OCM was harvested free of cells. Fresh and cryopreserved spermatozoa were washed in TCF, incubated in either OCM or M-199 for 1h, washed in  $\text{Ca}^{2+}$ -free PBS and  $\text{Ca}^{2+}$  determined as before. Cryopreserved spermatozoa again had more  $\text{Ca}^{2+}$ , than did fresh ( $P \leq 0.0001$ ) and fresh spermatozoa more  $\text{Ca}^{2+}$ , than did cryopreserved ( $P \leq 0.0001$ ). Spermatozoa incubated in OCM took up  $\text{Ca}^{2+}$  at a faster rate than spermatozoa incubated in supplemented M-199 ( $P \leq 0.0073$ ). OCM affected  $\text{Ca}^{2+}$ , of fresh and cryopreserved semen from the two stallions differently ( $P \leq 0.0001$ ). Fresh spermatozoa internalized exogenous  $\text{Ca}^{2+}$  more rapidly than cryopreserved spermatozoa ( $P \leq 0.0001$ ).  $\text{Ca}^{2+}$ , did not change over time. Spermatozoa from the two stallions responded differently to  $\text{Ca}^{2+}$  depending on the media ( $P \leq 0.0001$ ); cryopreservation remained a significant effector ( $P \leq 0.0001$ ). There were positive correlations between motility of spermatozoa and their  $\text{Ca}^{2+}$ , and negative correlations between number of normal acrosomes of spermatozoa and their  $\text{Ca}^{2+}$ ,.

In summary, there are differences between stallions but environment and oviductal cell product(s) affect  $\text{Ca}^{2+}$  internalization by equine spermatozoa. Cryopreservation strongly affects all aspects of spermatozoal  $\text{Ca}^{2+}$  control, regardless of all other factors.