

6 Zusammenfassung:

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob das In-vitro-Befruchtungsmodell beim Rind geeignet ist, den negativen Einfluß verschiedener Ca^{2+} -Antagonisten aus der Gruppe der Dihydropyridine auf die Teilungs- und Weiterentwicklungsraten festzustellen.

Aus Ovarien von Schlachtrindern gewonnene Oozyten wurden maturiert, in vitro befruchtet und für 7 Tage weiterkultiviert. Bei der In-vitro-Befruchtung wurden Ca^{2+} -Antagonisten durch den Einsatz unterschiedlicher Lösungsvermittler dem Kapazitations- und Befruchtungsmedium zugesetzt und die Teilungs- und Weiterentwicklungsraten einer Lösungsvermittlergruppe und einer Kontrollgruppe gegenübergestellt.

Beim Einsatz unterschiedlicher Lösungsvermittler für die Untersuchung von Ca^{2+} -Antagonisten hat sich nur Äthanol als geeignet erwiesen. Bei Untersuchungen dreier verschiedener Ca^{2+} -Antagonisten der Dihydropyridingruppe konnte nur beim Nifedipin ein signifikant negativer Einfluß auf die Teilungsraten bei einer hohen Konzentration festgestellt werden, die um den Faktor 30 über den therapeutischen Konzentrationen des Nifedipins liegt.

Die Ergebnisse der Untersuchungen ließen erkennen, daß durch die Feststellung der Teilungsraten im Rahmen des In-vitro-Befruchtungsmodells von Rinderoozyten, hemmende Einflüsse von Ca^{2+} -Antagonisten nachgewiesen werden können.

Zur Klärung des genauen Wirkungsmechanismus des Nifedipins vor und während der In-vitro-Befruchtung bedarf es weiterer spezieller Untersuchungen.

Folgende Ergebnisse wurden im Einzelnen ermittelt:

1. Die mittels Follikelpunktion aus Ovarien ($n=1930$) von Schlachtrindern gewonnene Zahl von Oozyten, die sich zur Maturation eigneten, betrug im Durchschnitt $4,1 (\pm 1,3)$ Oozyten pro Ovar. Nach der In-vitro-Befruchtung teilten sich im Mittel $59,0\% (\pm 7,8\%)$ der Oozyten. Das Stadium der einfriertauglichen Morula bzw. Blastozyste erreichten $21,8\% (\pm 7,6\%)$ aller geteilten Oozyten.

2. Bei einer Nifedipinkonzentration von $57,8 \mu\text{M}$ bzw. $577,5 \mu\text{M}$ im Kapazitationsmedium mit DMSO ($0,1\% - 1\%$) als Lösungsvermittler lagen die Teilungs- bzw. Weiterentwicklungsraten

in den Versuchs- und Kontrollgruppen zwischen 43,5 % und 57,7 % bzw. 17,6 % und 27,6 %. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen lagen nicht vor.

3. Bei einer Nifedipinkonzentration von 57,8 μM bzw. 577,5 μM Nifedipin mit DMSO (0,1 % - 1 %) als Lösungsvermittler im Kapazitations- und Befruchtungsmedium unterschieden sich die Teilungsraten (19,3 % bzw. 30,7%) gegenüber den DMSO-Gruppen (27,5 % bzw. 27,3 %) nicht signifikant. Die Teilungsraten der DMSO-Gruppen unterschieden sich signifikant ($p < 0,05$) von den Teilungsraten der Kontrollgruppen (58,7 % bzw. 52,7 %).

4. Bei einer Konzentration von 0,05 % - 0,1 % DMSO im Kapazitations- und Befruchtungsmedium kam es zu einer signifikanten ($p < 0,05$) Herabsetzung der Teilungsraten auf 32,5 % bzw. 29,7 % gegenüber der Kontrollgruppe von 55,1 %.

5. Bei einer Konzentration von 0,02 % Tetraglycol im Kapazitations- und Befruchtungsmedium wurde eine signifikante ($p < 0,05$) Herabsetzung der Teilungsraten auf 36,4 % gegenüber der Kontrollgruppe von 55,1 % festgestellt.

6. Bei Zusatz von drei verschiedenen Ca^{2+} -Antagonisten mit Äthanol (0,02 %) als Lösungsvermittler zum Kapazitations- und Befruchtungsmedium betragen die Teilungsraten der Äthanolgruppen zwischen 55,2 % - 65,7 %, die der Kontrollgruppen 60,3 % - 68,0 %. Die entsprechenden Weiterentwicklungsraten lagen zwischen 16,6 % - 21,8 % sowie 19,5% - 25,5 %. Es bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen.

7. Bei Nifedipinkonzentrationen bis zu 2,9 μM im Kapazitations- und Befruchtungsmedium mit Äthanol als Lösungsvermittler bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Teilungs- bzw. Weiterentwicklungsraten der Nifedipingruppen (59,2 % - 63,5 %) und den Äthanolgruppen (58,0 % - 65,7 %). Bei Erhöhung der Nifedipinkonzentration auf 5,8 μM kam es zu einer signifikanten ($p < 0,05$) Herabsetzung der Teilungsraten (33,7 %) gegenüber der Äthanolgruppe (55,2 %). Die Weiterentwicklungsraten der Nifedipingruppen (18,6 % - 20,9 %) unterschieden sich nicht signifikant von denen der Äthanolgruppen (16,7 % - 22,7 %).

8. Bei Nicardipinkonzentrationen von 3,9 μM und 7,8 μM im Kapazitations- und Befruchtungsmedium mit Äthanol als Lösungsvermittler bestanden zwischen den Teilungs- bzw. Weiterentwicklungsraten der Nicardipingruppen (50,8 % - 54,6 % bzw. 12,1 % - 16,6 %) und der Äthanolgruppen (51,9 % - 55,4 % bzw. 11,5 % - 17,1 %) keine signifikanten Unterschiede.

9. Bei Amlodipinkonzentrationen von 0,5 μM und 4,9 μM im Kapazitations- und Befruchtungsmedium mit Äthanol als Lösungsvermittler wurden Teilungs- und entsprechende Weiterentwicklungsraten in den Amlodipingruppen zwischen 55,2 % - 58,2 % und 18,7 % - 19,5 % sowie in den Äthanolgruppen zwischen 57,2 % - 58,5 % und 18,2 % - 20,5 % ermittelt. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen lagen nicht vor.

10. Der Einfluß der drei verschiedenen Ca^{2+} -Antagonisten auf die Akrosomablösung der Spermien nach zweistündiger Inkubation wurde in Konzentrationen bis zu 5,8 μM untersucht. Beim Nifedipin wurden 9,1 % abgelöste Akrosomen, gegenüber 4,9 % beim Nicardipin und 7,9 % beim Amlodipin festgestellt. Es bestanden keine signifikanten Unterschiede.

Markus Sekulla

Investigations to analyse the influence of different dihydropyridine calcium channel antagonists on the cleavage and developmental rates after in vitro fertilization of cattle oocytes

SUMMARY

In the present study it was to be investigated if the model of in vitro fertilization of cattle oocytes can be used to find out a negative influence of different dihydropyridine calcium channel antagonists on the cleavage and developmental rates.

For these experiments oocytes of ovaries of slaughtercattle were matured, in vitro fertilized and cultured for seven days. During in vitro fertilization calcium channel antagonists were solved in capacitation and fertilization medium with use of different solvents. The rates of cleavage and development were compared with results in solvent and control groups.

Using different solvents only ethanol was suitable for these investigations. Investigations of three different dihydropyridine calcium channel antagonists showed, that only nifedipine had a significant influence on cleavage rates at a concentration that is 30 times higher than the therapeutic concentrations of nifedipine.

The results of this study showed that the model of in vitro fertilization of cattle oocytes with determining cleavage rates is suitable to demonstrate obstructical influences of calcium channel antagonists. To clarify the mechanism of action of nifedipine during in vitro fertilization it needed further special investigations.

The following results were obtained:

1. After follicle punctation of ovaries (n= 1930) of slaughtercattles an average of 4,1 (\pm 1,3) of oocytes suitable for maturation were obtained per ovary. After in vitro fertilization an average of 59,0 % (\pm 7,8 %) of the oocytes cleaved. The stage of freezable morulae or blastocysts reached 21,8 % (\pm 7,6 %) of the cleaved oocytes.

2. At concentrations of 57,8 μ M resp. 577,5 μ M nifedipine in capacitation medium using DMSO (0,1% - 1 %) as solvent the cleavage and developmental rates in experimental and

control groups differed between 43,5 % and 57,7 % resp. 17,6 % and 27,6 %. The differences between the groups were not significant.

3. At concentrations of 57,8 μM resp. 577,5 μM nifedipine in capacitation and fertilization medium using DMSO (0,1 % - 1 %) as solvent the differences between the cleavage rates of nifedipine groups (19,3 % resp. 30,7 %) and DMSO groups (27,5 % resp. 27,3%) were not significant. The cleavage rates of DMSO groups differed significantly ($p < 0,05$) from the cleavage rates of control groups (58,7 % resp. 52,7 %).

4. At concentrations of 0,05 % - 0,1 % DMSO in medium for capacitation and fertilisation a significant ($p < 0,05$) reduction of cleavage rates to 32,5 % resp. 29,7 % vs. 55,1 % of the control group was observed.

5. A concentration of 0,02 % tetraglycol in capacitation and fertilisation medium led to a significant ($p < 0,05$) reduction of cleavage rates to 36,4 % vs. 55,1 % of the control group.

6. Solving three different calcium channel antagonists with ethanol (0,02 %) as solvent in capacitation and fertilisation medium cleavage rates of ethanol groups varied between 55,2 % - 65,7 %, the rates of the control groups between 60,3 % - 68,0 %. Corresponding developmental rates varied between 16,6 % - 21,8 % resp. 19,5 % - 25,5 %. The differences between the groups were not significant.

7. At concentrations up to 2,9 μM nifedipine with ethanol (0,02 %) as solvent in capacitation and fertilisation medium no significant differences between cleavages rates rates of nifedipine groups (59,2 % - 63,5 %) and ethanol groups (58,0 % - 65,7 %) could be observed.

When the concentration of nifedipine was raised up to 5,8 μM a significant ($p < 0,05$) reduction of cleavages rates to 33,7 % vs. 55,2 % in the ethanol group was determined. The developmental rates of all nifedipine groups (18,6 % - 20,9 %) differed not significantly of ethanol groups (16,7 % - 22,7 %).

8. Concentrations of 3,9 μM and 7,8 μM nicardipine in medium for capacitation and fertilisation with ethanol as solvent showed no significant differences in cleavages resp. developmental rates of nicardipine groups (50,8% - 54,6 % resp. 12,1 % -16,6 %) vs. ethanol groups (51,9 % - 55,4 % resp. 11,5 % - 17,1 %).

9. At concentrations of 0,5 μM and 4,9 μM amlodipine in capacitation and fertilisation medium with ethanol as solvent were cleavages rates and corresponding developmental rates of 55,2 % - 58,2 % and 18,7 % - 19,5 % in amlodipine groups and of 57,2 % - 58,5 % and 18,2 % - 20,5 % in ethanol groups observed. The differences between the groups were not significant.

10. The influence of three different calcium channel antagonists in concentrations up to 5,8 μM in capacitation medium on the detaching of the acrosome of sperm cells was observed after an in vitro incubation of two hours. Nifedipine showed 9,1 % sperms with detached acrosomes, compared with 4,9 % of nicardipine and 7,9 % of amlodipine. The differences between the calcium channel antagonists were not significant.