

## 5. Zusammenfassung

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit bestand darin, die Kenntnisse über die von SEKULJA (1996) ermittelten hemmenden Einflüsse des  $\text{Ca}^{2+}$ -Antagonisten Nifedipin in einer Konzentration von  $2\mu\text{g/ml}$  auf die Teilungsraten von Rindereizellen nach In-vitro-Befruchtung zu erweitern (vgl. S.82). Dazu sollte geklärt werden, ob der Einfluß von Nifedipin auf das Befruchtungsgeschehen über die Parameter Membranintegrität von Spermien nach Färbung mit Hoechst 33258 und Vorkernbildung nach Acetoorceinfärbung nachzuweisen ist.

Für die Überprüfung der Membranintegrität wurde Frisch- wie auch Tiefgefriersperma verwandt, das ohne und nach Spermaaufbereitungsverfahren getestet wurde. Für die In-vitro-Produktion wurden geeignete Oozyten maturiert, in vitro befruchtet und anschließend kultiviert. Die erfolgreiche In-vitro-Befruchtung wurde nach Fixation und Färbung mittels Acetoorcein durch die Beurteilung der Vorkernentwicklung überprüft. Gleichzeitig wurden bei unfixierten Oozyten die Teilungsraten ermittelt.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde mittels der beschriebenen Parameter überprüft, ob bei Verwendung von Sperma verschiedener Bullen individuelle Einflüsse in den Versuchsergebnissen sichtbar werden. Dazu wurde Tiefgefriersperma von fünf Bullen, die sich hinsichtlich ihrer non-return Raten in der künstlichen Besamung unterschieden, verwandt. Den Versuchsgruppen wurde dabei in Anlehnung an die von SEKULJA (1996) erzielten Ergebnisse eine Nifedipinkonzentration von  $2\mu\text{g/ml}$  zugesetzt.

Folgende Ergebnisse wurden im Einzelnen ermittelt:

1. Nach Zugabe von 1, 2 und  $10\mu\text{g/ml}$  Nifedipin zu unbehandeltem Frisch- bzw. Tiefgefriersperma eines Bullen konnte kein Anstieg an total membrangeschädigten Spermazellen in den Versuchsgruppen ermittelt werden.
2. Nach Spermaaufbereitungsverfahren konnte ein Abfall bei den membranintakten sowie ein Anstieg bei den total membrangeschädigten Samenzellen am Ende des Untersuchungszeitraum festgestellt werden. Der Abfall bzw. der Anstieg war in den Versuchsgruppen mit Nifedipinzusatz ( $2\mu\text{g/ml}$ ) höher als in den entsprechenden Kontrollgruppen, was jedoch wegen der zum Teil großen Streuung nicht immer statistisch abgesichert werden konnte.

3. Der Zusatz von Heparin (1 und 10  $\mu\text{g/ml}$ ) zu Tiefgefriersperma hatte keinen Einfluß auf die Ergebnisse der Färbung mit Hoechst 33258 nach Nifedipinzusatz (2 $\mu\text{g/ml}$ ). Nach Spermaaufbereitung kam es auch ohne Heparinzusatz zu einem signifikanten Anstieg an total membrangeschädigten Samenzellen von 13,3% auf 25,7% in der Kontrolle bzw. von 22,6% auf 42,3% in der Versuchsgruppe. Danach hat ein Heparinzusatz zur Kapazitationsauslösung keinen Einfluß auf die Schädigung der Membranintegrität von Spermien nach Nifedipinzusatz.
4. Bei Verwendung von Mischsperma und Nifedipinkonzentrationen von 1 bzw. 2 $\mu\text{g/ml}$  kam es zu einer Erniedrigung der Penetrations- und Teilungsraten nach In-vitro-Befruchtung. Eine Nifedipinkonzentration von 2 $\mu\text{g/ml}$  führte zu einer signifikanten ( $p < 0,01$ ) Herabsetzung der Vorkernbildung in der Versuchs- (42,2% bzw. 36,2% mit/ohne Polyspermie) gegenüber der Kontrollgruppe (62,8% bzw. 54,8% mit/ohne Polyspermie). Auch bei den Teilungsraten war die Herabsetzung zwischen Kontroll- (55,1%) und Versuchsgruppe (28,7%) mit  $p < 0,01$  signifikant.
5. Die Vorkernbildung nach Fixation der Oozyten zu verschiedenen Zeitpunkten (16, 20, 24 Stunden) nach Befruchtung war in der Versuchsgruppe mit Zugabe von 2 $\mu\text{g/ml}$  Nifedipin verzögert. Während die Ergebnisse in den Kontrollgruppen zu allen drei Fixationszeitpunkten nahezu übereinstimmten (64,6% zu 68,6% zu 67,1%), stieg die Anzahl der Vorkerne in der Versuchsgruppe signifikant von 20,6% über 36,2% auf 46,6% an.
6. Mit unbehandeltem Sperma von fünf unterschiedlichen Bullen konnte ein individueller Einfluß auf die Schädigung der Plasamamembranintegrität nach Nifedipinzusatz festgestellt werden. Bei drei der fünf Bullen kam es zu signifikanten Unterschieden zwischen Kontroll- und Versuchsgruppen in den verschiedenen Zellkategorien, während zwei Bullen keine Unterschiede zwischen Kontroll- und Versuchsgruppen zeigten. Nach Anwendung eines Spermaaufbereitungsverfahrens konnten hingegen keine deutlichen Unterschiede hinsichtlich der Wirkung von Nifedipin zwischen den Samenproben einzelner Bullen nachgewiesen werden. Bei allen Bullen stiegen die Anteile an total membrangeschädigten Spermien sowohl in der Kontroll- wie auch Versuchsgruppe über den Untersuchungszeitraum an und es kam zu signifikanten Unterschieden zwischen Kontroll- und Versuchsgruppen.

7. Individuelle Bullenunterschiede traten ebenfalls auf, wenn Nifedipin den Medien zur In-vitro-Befruchtung zugesetzt war. Während bei drei der fünf Bullen keine Unterschiede zwischen Kontroll- und Versuchsgruppen bei den Penetrations- und Teilungsraten auftraten, kam es bei zwei Bullen zum Abfall der Penetrationsraten in den Versuchsgruppen, die für einen Bullen mit  $p < 0,01$  statistisch signifikant waren (Abfall von 55,5% bzw. 50,4% mit/ohne Polyspermie in der Kontrolle auf 27,2 bzw. 24,9% in der Versuchsgruppe). Für beide Bullen zeigten auch die Teilungsraten einen Abfall zwischen Kontroll- und Versuchsgruppe (48,2% vs. 36,45% bzw. 42,8% vs. 26,8%).
  
8. Zusammenfassend legen die vorliegenden Ergebnisse nahe, daß schädigende Einflüsse des  $Ca^{2+}$ -Antagonisten Nifedipin auf die Membranintegrität von Spermien je nach verwendetem Sperma nur nach Anwendung eines Spermaaufbereitungsverfahrens sichtbar gemacht werden können. Der Grund dafür bleibt allerdings ungeklärt. Durch die Versuchsergebnisse nachweisbare individuelle Einflüsse bei Verwendung von Sperma verschiedener Bullen lassen erkennen, daß eine unterschiedliche individuell bedingte Empfindlichkeit oder Resistenz der Spermien gegenüber einem schädigenden Einfluß des  $Ca^{2+}$ -Antagonisten Nifedipin bestehen muß. Da eine objektive Beurteilung der Membranintegrität von Spermien nach Färbung mit Hoechst 33258 schwierig und aufwendig ist, sind zum Nachweis schädigender Einflüsse des  $Ca^{2+}$ -Antagonisten Nifedipin die Penetrations- und Teilungsraten besser geeignet.

## **Kerstin Behrens**

Investigations to indicate effects of the  $\text{Ca}^{2+}$ -antagonist nifedipine on the sperm membrane integrity and on the penetration and cleavage rates of bovine oocytes after in vitro fertilization

### **Summary**

The task of the present study is to enhance the knowledge of the investigation of SEKULIJA (1996) about the restraining effect of the  $\text{Ca}^{2+}$ -antagonist nifedipine in concentrations of  $2\mu\text{g/ml}$  to cleavage rates of bovine oocytes after in vitro fertilization (see p. 82). First it was clarified whether the effect of nifedipine can be indicated by the parameters membrane integrity of the sperms after staining with Hoechst 33258 and pronucleus formation after acetoorcein staining.

For examination the membrane integrity both fresh and frozen-thawed sperm were used and tested in two different ways, either without or with sperm separation procedure.

For in vitro production suitable oocytes were matured, fertilized in vitro and subsequently cultivated. The successful in vitro fertilization was determined by fixing, staining with acetoorcein and evaluation of the pronucleus formation. At the same time the cell cleavage rate of non-fixed oocytes were determined.

In the second part of the experimental work, it was examined whether an individual effect of the sperm of different bulls on the results of the experiments could be made visible. For this purpose, frozen-thawed sperm of five bulls, different in regard to their non-return rates in artificial insemination, was used for the experiments. Nifedipine with a concentration of  $2\mu\text{g/ml}$  was added to all experimental groups.

The following results were obtained:

1. After adding 1, 2 or  $10\mu\text{g/ml}$  nifedipine to untreated fresh sperm respectively untreated frozen-thawed sperm of one bull no significant increase in the number of totally damaged cells could be observed.
2. After the use of sperm separation procedures a decrease in the number of membrane intact sperm cells and a increase in the number of totally damaged sperm cells could be observed

at the end of the investigation period. Consequently, the decrease respectively increase in the experimental groups with nifedipine addition (2 µg/ml) were stronger than in the control groups. Here the high deviations in the single results were striking.

3. It could be demonstrated that the presence of heparin (1 and 10 µg/ml) in frozen-thawed sperm had no effect on the results of staining with Hoechst 33258 after adding nifedipine (2 µg/ml). After sperm separation procedure without heparin admixture, the percentage of totally damaged sperm cells increased from 13.3% to 25.7% in the control group respectively from 22.6% to 42.3% in the experimental group. Consequently a heparin supplement to induce the capacitation had no effect on the damage of the membrane integrity of sperms after nifedipine addition.
4. While using mixed sperm and nifedipine concentration of 1 respectively 2 µg/ml, the penetration and cell cleavage rates decreased after in vitro fertilization. A nifedipine concentration of 2 µg/ml caused a significant ( $p < 0.01$ ) decrease of the penetration rate in the experimental group (42.2% resp. 36.2% with/without polyspermy) in comparison to the control group (62.8 resp. 54.8% with/without polyspermy). As far as the cell cleavage rates are concerned, the decrease from the control group (55.1%) to the experimental group (28.7%) with  $p < 0.01$  was also significant.
5. The appearance of the pronuclei after fixing the oocytes at different time intervals (16, 20 and 24 hours) after fertilization showed that the pronucleus formation in the experimental group after adding 2 µg/ml nifedipine was delayed. While the results in the control groups were nearly concordant (64.6%, 68.8% and 67.1%) at all three different time intervals, the percentage of formed pronuclei in the experimental group increased significantly from 20.6% to 36.2% to 46.6%.
6. Trough the use of untreated sperm of five different bulls, an individual influence on damaging effect on the plasma membrane integrity of sperms could be made visible. Three of the five bulls showed significant differences between control and experimental groups, while two bulls showed no differences between control and experimental groups. After application of a sperm separation procedure however no clear differences in the sperm samples of different bulls could be indicated with regard to the effect of a 2 µg/ml

nifedipine concentration. The percentage of totally damaged sperm cells both in the control and the experimental group increased for all bulls over the investigation period. For all bulls significant differences were found between the control and the experimental group.

7. Individual differences between bulls also emerged after addition of 2  $\mu\text{g/ml}$  nifedipine to the medium for the *in vitro* fertilization of oocytes. Three of the five bulls showed no differences between the control and experimental groups both with regard to the determined penetration rates and the cell cleavage rates. The penetration rate for two bulls sharply declined in the experimental groups which was statistically significant for one bull with  $p < 0.01$  (decrease from 55.5% resp. 50.4% with/without polyspermy in the control group to 27.2% resp. 24.9% in the experimental group). For both bulls, the cell cleavage rates also showed a decrease between control and experimental group (48.2% vs. 36.5% and 42.8% vs 26.8%).
8. In summary, the presented results allow the conclusion, that damaging effects of the  $\text{Ca}^{2+}$ -antagonist nifedipine on the membrane integrity of sperm cells according to the used sperm could be made visible only after the application of preceding sperm separation procedures. The reason for this is still unknown. Significant individual effects on the experimental results during the use of sperm from different bulls lead to the conclusion that there is an individually different sensitivity or resistance of the sperm cells to a damaging effect of the  $\text{Ca}^{2+}$ -antagonist nifedipine. As an objective evaluation of the membrane integrity of sperms after staining with Hoechst 33258 is difficult and time consuming, results of the penetration and cell cleavage rates are more suitable for detection of damaging effects.