

Nachweis erbracht werden, daß mit der in dieser Arbeit angewandten Methodik kein Einfluß des Nifedipins auf den Spermienstoffwechsel erkennbar wurde. Die verwendete niedrige Nifedipinkonzentration entsprach hierbei in etwa dem therapeutischen Plasmaspiegel des Menschen. Ob diese hier angewandten Modelle mit Rinderoozyten und -spermien und die damit erbrachten Ergebnisse einen Vergleich zur Humanmedizin erlauben, kann nicht endgültig beantwortet werden. Ihr Modellcharakter bleibt jedoch unbestritten. Weitere Erkenntnisse sind auch bei Wiederholungen der angewandten Methodik nicht mehr zu erwarten.

## 6. Zusammenfassung

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollte das Wissen über die von SEKULLA (1996) und BEHRENS (1997) ermittelten hemmenden Einflüsse des  $Ca^{2+}$ -Antagonisten Nifedipin, als Vertreter der Dihydropyridine, in einer Konzentration von 71,43 µg/l, 321,43 µg/l und 1428,0 µg/l auf die Teilungs- und Weiterentwicklungsraten von Rindereizellen nach In-vitro-Befruchtung ergänzt und abgeschlossen werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten die äußeren Cholesterinanteile der Spermienplasmamembran mittels HPLC bestimmt und mit einer kombinierten Methode aus Inkubation und HPLC-Messung der Einfluß des Nifedipins auf den Spermienstoffwechsel zu erklären versucht werden. Zur Bestimmung der oberflächlichen Cholesterinanteile der Spermienplasmamembran erwies sich ein entwickeltes HPLC-Meßverfahren als geeignet.

Folgende Ergebnisse wurden im Einzelnen ermittelt:

1. Die mittels Slicing-Methode aus 925 Eierstöcken von Schlachtrindern gewonnene Anzahl von Eizellen betrug im Durchschnitt 15,5 ( $\pm$  3,4) Eizellen pro Ovar. Nach der In-vitro-Befruchtung erreichten 48,2 % der Oozyten das 2-8 Zellstadium. Das Stadium der Blastozysten erreichten 26,4 % aller geteilten Oozyten.
2. Für den Lösungsvermittler Adalat™-Placebo bzw. Äthanol lagen die Teilungsraten mit Sperma der Bullen Eifel, Streifer, Radik und Zitat zwischen 42,0% - 84,9% bzw. 47,0% -

60,9% gegenüber 51,5% - 83,4% bzw. 40,0% - 52,4% in der zugehörigen Kontrollgruppe. Signifikante Unterschiede zwischen den Lösungsvermittler- und ihren Kontrollgruppen bestanden nicht.

3. Für den Lösungsvermittler Adalat™-Placebo bzw. Äthanol lagen die Weiterentwicklungsraten mit Sperma der Bullen Eifel, Streifer, Radik und Zitat zwischen 4,8% - 23,8% bzw. 27,8% - 51,0% gegenüber 4,0% - 27,8% bzw. 24,9% - 36,0% in der entsprechenden Kontrollgruppe. Signifikante Unterschiede zwischen den Lösungsvermittler- und ihren Kontrollgruppen lagen nicht vor.

4. Für Sperma des Bullen Eifel lagen die Teilungsraten bei Zusatz der Nifedipinkonzentrationen 71,43µg/l, 321,43µg/l, 1428,0µg/l mit dem Lösungsvermittler Adalat™-Placebo bzw. Äthanol zwischen 43,5% - 48,2% bzw. 39,5% - 46,5% gegenüber 61,0% bzw. 53,9% in der entsprechenden Kontrollgruppe. Bei den drei Nifedipinkonzentrationen im Kapazitationsmedium mit Adalat™-Placebo bzw. bei der Nifedipinkonzentration 1428,0µg/l mit Äthanol kam es zu einer signifikanten ( $p < 0,05$ ) Herabsetzung der Teilungsrate auf 47,8%, 48,2%, 43,5% bzw. 39,5% gegenüber der zugehörigen Kontrolle von 61,0% bzw. 53,9%. Die entsprechenden Weiterentwicklungsraten lagen für Nifedipin mit Adalat™-Placebo zwischen 30% - 42,8% bzw. für Nifedipin mit Äthanol zwischen 32,8% - 45,9%, die der Kontrollgruppen 33,3% bzw. 27,4%. Hierbei bestanden keine signifikanten Unterschiede.

5. Für Sperma des Bullen Streifer lagen die Teilungsraten bei Zugabe der Nifedipinkonzentrationen 71,43µg/l, 321,43µg/l, 1428µg/l mit dem Lösungsvermittler Adalat™-Placebo bzw. Äthanol zwischen 26,9% - 36,8% bzw. 22,5% - 29,4% gegenüber 40,9% bzw. 32,9% in der entsprechenden Kontrolle. Bei der Nifedipinkonzentration 1428µg/l mit Adalat™-Placebo bzw. mit Äthanol kam es zu einer signifikanten ( $p < 0,05$ ) Reduzierung der Teilungsrate auf 26,9% bzw. 22,5% gegenüber der dazugehörigen Kontrollgruppe von 40,9% bzw. 32,9%. Die entsprechenden Weiterentwicklungsraten betragen für Nifedipin mit Adalat™-Placebo zwischen 33,4% - 46,7% bzw. für Nifedipin mit Äthanol 26,2% - 36,8%, die der Kontrollen 41,7% bzw. 33,8%. Hierbei lagen keine signifikanten Unterschiede vor.

6. Für Mischsperma der Bullen Radik und Zitat lagen die Teilungsraten bei Zusatz der Nifedipinkonzentrationen 71,43µg/l, 321,43µg/l, 1428µg/l mit Adalat™-Placebo bzw. Äthanol zwischen 29,6% - 33,3% bzw. 27,1% - 36,6% gegenüber 39,8% bzw. 47,9% in der entsprechenden Kontrollgruppe. Bei der Nifedipinkonzentration 1428µg/l mit Äthanol kam es zu einer signifikanten ( $p < 0,05$ ) Herabsetzung der Teilungsrate auf 27,1% gegenüber der Kontrolle von 47,9%. Die Weiterentwicklungsraten betragen für Nifedipin mit Adalat™-Placebo zwischen 27,2% - 34,4% bzw. für Nifedipin mit Äthanol 40,3% - 47,2%, die der Kontrollgruppen 25,4% bzw. 31,7%. Hierbei bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

7. Für Spermia des Bullen Radik betragen die Teilungsraten bei Zusatz der Nifedipinkonzentrationen 71,43µg/l, 321,43µg/l, 1428µg/l mit Äthanol 33,8%, 27,9% und 23,0% gegenüber 51,6% in der Kontrollgruppe. Die Unterschiede der Teilungsraten der Nifedipin-Behandlungsgruppen waren gegenüber der Kontrollgruppe signifikant ( $p < 0,05$ ). Die Weiterentwicklungsraten für die Nifedipin-Behandlungsgruppen lagen zwischen 30,0% - 44,4%, die der Kontrolle 26,9%. Signifikante Unterschiede der Weiterentwicklungsraten zwischen der Kontrollgruppe und den Behandlungsgruppen lagen nicht vor.

8. Für Spermia des Bullen Zitat lagen die Teilungsraten bei Zusatz der Nifedipinkonzentrationen 71,43µg/l, 321,43µg/l, 1428µg/l mit Äthanol bei 48,6%, 33,3% und 22,9% gegenüber 54,2% in der Kontrollgruppe. Die Weiterentwicklungsraten für die Nifedipin-Behandlungsgruppen lagen zwischen 33,1% - 36,8% gegenüber 32,9% in der Kontrolle. Signifikante Unterschiede der Teilungs- und Weiterentwicklungsraten zwischen der Kontrollgruppe und den Behandlungsgruppen bestanden nicht.

9. Der oberflächliche Cholesterinanteil des Mischspermias der Bullen Eifel, Streifer, Radik und Zitat betrug im Mittel 0,185 µmol/ 1 Million Spermien ( $SD=0,09$ ).

10. Der Anteil an Membrancholesterin boviner Spermien im Umgebungsmedium lag für die Kontrollgruppen der Tiere Streifer, Radik, Zitat und Dummer bei 0,076 , 0,0263 , 0,0191 und 0,0781µmol/ 1 Mio. Spermien, für die Adalat™-Placebo-Gruppen der Tiere Eifel, Streifer,

Zitat und Dimmer bei 0,0311 , 0,1088 , 0,0492 und 0,0392 $\mu$ mol/l Mio. Spermien, für die Nifedipinkonzentration 71,43 $\mu$ g/l mit Adalat™-Placebo der Tiere Eifel, Streifer, Radik, Zitat und Dimmer bei 0,0419 , 0,0422 , 0,1497 , 0,0334 und 0,0612 $\mu$ mol/l Mio. Spermien und für die Nifedipinkonzentration 1428 $\mu$ g/l mit Adalat™-Placebo der Bullen Eifel, Streifer, Radik, Zitat und Dimmer bei 0,0467 , 0,0615 , 0,0211, 0,044 und 0,0244 $\mu$ mol/l Mio. Spermien. Es bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kontroll-, Lösungsvermittler- und Behandlungsgruppen.

11. Der Anteil an Membrancholesterin boviner Spermien im Umgebungsmedium lag für den Bullen Eifel bei durchschnittlich 0,0399  $\mu$ mol/ 1 Million Spermien, für Radik bei 0,0412, für Zitat bei 0,0389, für Dimmer bei 0,0464 und für Streifer bei 0,0777  $\mu$ mol/ 1 Million Spermien. Es bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Bullen.

12. Das ermittelte freigesetzte Cholesterin der Spermienplasmamembranen betrug in Analyseeinheit A im Mittel 0,0466, in Analyseeinheit B 0,0743, in Analyseeinheit C 0,0132 und in Analyseeinheit D 0,0665  $\mu$ mol/ 1 Million Spermien. Signifikante Unterschiede lagen nicht vor.

13. Der bovine spermale Plasmamembran-Cholesterinanteil im Umgebungsmedium lag nach Zugabe des Lösungsvermittlers AP bei 0,0563, nach Zugabe der Nifedipinkonzentration 1 mit AP bei 0,0695, nach Zusatz der Nifedipinkonzentration 3 mit AP bei 0,0429 gegenüber 0,0515  $\mu$ mol/ 1 Million Spermien in der Kontrolle. Es bestanden keine signifikanten Unterschiede.

14. Das ermittelte freigesetzte Cholesterin der Spermienplasmamembranen, bezogen auf das Sperma des Bullen pro Analyseeinheit, lag zwischen 0,0132 für Sperma des Bullen Radik in Analyseeinheit B und 0,1497  $\mu$ mol/ 1 Million Spermien ebenfalls für Sperma des Bullen Radik in Analyseeinheit D.

**Mirko Robert Köbier**

Investigations to determine the effect of different concentrations of the  $\text{Ca}^{2+}$ -antagonist nifedipine on the results of an in vitro fertilization of bovine oocytes and on the cholesterol shares in bovine sperm membranes.

**Summary**

The first part of this investigation supplements and concludes the knowledge of the inhibitory effects of the  $\text{Ca}^{2+}$ -antagonist nifedipine, a dihydropyridine, on the fertilization and further developmental rates of bovine oocytes after in vitro fertilization at concentrations of 71.43  $\mu\text{g/l}$ , 321.43  $\mu\text{g/l}$  and 1428.0  $\mu\text{g/l}$  as determined earlier by SEKULIA (1996) and BEHRENS (1997).

In the second part of the investigation, the external cholesterol shares of the sperm plasma membrane are determined by means of HPLC and attempts were made to explain the influence of nifedipine on the sperm metabolism through a combined method with incubation and HPLC measurement. An HPLC measurement method which was developed proved to be suitable to determine the surface cholesterol shares on the sperm plasma membrane.

The following results were obtained:

1. The mean number of oocytes obtained from 925 ovaries of slaughtered cattle by means of the slicing method was 15.5 ( $\pm$  3.4) oocytes per ovary. Following in vitro fertilization, 48.2 % of the oocytes reached the 2-8 cell stage. 26.4 % of all fertilized oocytes reached the blastocyst stage.
2. The fertilization rates with semen from the bulls Eifel, Streifer, Radik and Zitat for the solubilisers Adalat<sup>TM</sup>-Placebo and ethanol were between 42.0%-84.9% and 47.0%-60.9% respectively compared to 51.5%-83.4% and 40.0%-52.4% in the corresponding control groups. There were no significant differences between the solubiliser groups and their control groups.

3. The further developmental rates with semen from the bulls Eifel, Streifer, Radik and Zitat for the solubilisers Adalat<sup>TM</sup>-Placebo and ethanol were between 4.8%-23.8% and 27.8%-51.0% respectively compared to 4.0%-27.8% and 24.9%-36.0% in the corresponding control groups. There were no significant differences between the solubiliser groups and their control groups.

4. The fertilization rates for semen from the bull Eifel following the addition of nifedipine in concentrations of 71.43 µg/l, 321.43 µg/l and 1428.0 µg/l to the solubilisers Adalat<sup>TM</sup>-Placebo and ethanol were between 43.5%-48.2% and 39.5%-46.5% respectively compared to 61.0% and 53.9% in the corresponding control groups. With the three nifedipine concentrations in capacitation medium with Adalat<sup>TM</sup>-Placebo as well as the nifedipine concentration 1428.0µg/l with ethanol there was a significant ( $p<0.05$ ) reduction in the fertilization rate to 47.8%, 48.2%, 43.5% and 39.5% compared to the corresponding control groups with 61.0% and 53.9%. The corresponding further developmental rates for nifedipine with Adalat<sup>TM</sup>-Placebo were between 30%-42.8% and for nifedipine with ethanol between 32.8%-45.9%, those for the control group were 33.3% and 27.4% respectively. There were no thus significant differences.

5. The fertilization rates for semen from the bull Streifer following the addition of nifedipine in concentrations of 71.43 µg/l, 321.43 µg/l and 1428.0 µg/l to the solubilisers Adalat<sup>TM</sup>-Placebo and ethanol were between 26.9%-36.8% and 22.5%-29.4% respectively compared to 40.9% and 32.9% in the corresponding control groups. With the nifedipine concentration 1428.0µg/l in Adalat<sup>TM</sup>-Placebo and ethanol there was a significant ( $p<0.05$ ) reduction in the fertilization rate to 26.9% and 22.5% respectively compared to the corresponding control groups with 40.9% and 32.9%. The corresponding further developmental rates for nifedipine with Adalat<sup>TM</sup>-Placebo were between 33.4%-46.7% and for nifedipine with ethanol between 26.2%-36.8%, those for the control group were 41.7% and 33.8% respectively. There were no thus significant differences.

6. The fertilization rates for mixed semen from the bulls Radik and Zitat following the addition of nifedipine in concentrations of 71.43 µg/l, 321.43 µg/l and 1428.0 µg/l to the solubilisers Adalat<sup>TM</sup>-Placebo and ethanol were between 29.6%-33.3% and 27.1%-36.6%

respectively compared to 39.8% and 47.9% in the corresponding control groups. With the nifedipine concentration 1428.0 µg/l in ethanol there was a significant ( $p < 0.05$ ) reduction in the fertilization rate to 27.1% compared to the corresponding control group with 47.9%. The further developmental rates for nifedipine with Adalat<sup>TM</sup>-Placebo were between 27.2%-34.4% and for nifedipine with ethanol between 40.3%-47.2%, those for the control group were 25.4% and 31.7% respectively. There were no thus significant differences between the groups.

7. The fertilization rates for semen from the bull Radik following the addition of nifedipine in concentrations of 71.43 µg/l, 321.43 µg/l and 1428.0 µg/l to ethanol were 33.8%, 27.9% and 23.0% compared to 51.6% in the control group. The differences in fertilization rates between the nifedipine group and the control group were significant ( $p < 0.05$ ). The further development rates for the nifedipine group were between 30.0%-44.4%, those for the control group were 26.9%. There were no significant differences in the further developmental rates between the control group and the treatment groups.

8. The fertilization rates for semen from the bull Zitat following the addition of nifedipine in concentrations of 71.43 µg/l, 321.43 µg/l and 1428.0 µg/l to ethanol were 48.6%, 33.3% and 22.9% compared to 54.2% in the control group. The further developmental rates for the nifedipine group were between 33.1%-36.8% compared to 32.9% in the control group. There were no significant differences in the fertilization rates and further developmental rates between the control group and the treatment groups.

9. The mean surface cholesterol share in the mixed semen from the bulls Eifel, Streifer, Radik and Zitat was 0.185 µmol/l million spermatozoa.

10. The share of membrane cholesterol of bovine spermatozoa in the ambient medium for the control groups of the animals Streifer, Radik, Zitat and Dimmer was 0.076, 0.0263, 0.0191 and 0.0781 µmol/l million spermatozoa, for the Adalat<sup>TM</sup>-Placebo groups of the animals Eifel, Streifer, Zitat and Dimmer 0.0311, 0.1088, 0.0492 and 0.0392 µmol/l million spermatozoa, for the nifedipine concentration 71.43 µg/l with Adalat<sup>TM</sup>-Placebo for the animals Eifel, Streifer, Radik, Zitat and Dimmer 0.0419, 0.0422, 0.1497, 0.0334 and 0.0612 µmol/l million spermatozoa and for the nifedipine concentration 1428 µg/l with Adalat<sup>TM</sup>.

Placebo for the animals Eifel, Streifer, Radik, Zitat and Dimmer 0.0467, 0.0615, 0.0211, 0.044 and 0.0244  $\mu\text{mol/l}$  million spermatozoa. There were no significant differences between the control, solubiliser and treatment groups.

11. The mean share of membrane cholesterol of bovine spermatozoa in the ambient medium for the bull Eifel was 0.0399  $\mu\text{mol/l}$  million spermatozoa, for Radik 0.0412, for Zitat 0.0389, for Dimmer 0.0464 and for Streifer 0.0777  $\mu\text{mol/l}$  million spermatozoa. There were no significant differences between the bulls.

12. The mean released cholesterol determined for the sperm plasma membrane in analysis unit A was 0.0466, in analysis unit B 0.0743, in analysis unit C 0.0132 and in analysis unit D 0.0665  $\mu\text{mol/l}$  million spermatozoa. There were no significant differences.

13. The bovine sperm plasma membrane cholesterol share in the ambient medium following addition of the solubiliser AP was 0.0563, following addition of the nifedipine concentration 1 with AP 0.0695, following addition of the nifedipine concentration 3 with AP 0.0429 compared to 0.0515  $\mu\text{mol/l}$  million spermatozoa in the control group. There were no significant differences.

14. The released cholesterol determined for the sperm plasma membrane, relative to the semen of the bulls per analysis unit, was between 0.0132 for semen from the bull Radik in analysis unit B and 0.1497  $\mu\text{mol/l}$  million spermatozoa, similarly for semen from the bull Radik in analysis unit D.