Chlortetracycline fluoresence 분석을 통한 수정능 획득 과정에서의 Ca^{2+}-ATPase 역할

상지대학교 한의과대학 해부학교실, 연세대학교 문리대학 생명과학과*

박경식, 장재호*

Ca^{2+}-ATPase role in the acrosome reaction assessed by a chlortetracycline fluorescence assay

Gyung-Sik Park, Jae-Ho Chang*

Department of Anatomy, School of Oriental Medicine, Sangji University, Wonju, Korea
Department of Life Science, School of Liberal Arts & Sciences, Yonsei University, Wonju, Korea*

= **Abstract** =

It has been reported that the Ca^{2+}-ATPase and the Ca^{2+}-Na^{+} exchanger play important role for the regulation of intracellular Ca^{2+} in somatic cells, the Ca^{2+}-ATPase located in the plasma membrane helps the Ca^{2+} concentration in maintain low $[Ca^{2+}]_i$. And Roldan & Fleming(1989) reported that the spermatozoan Ca^{2+}-ATPase plays an important role in the capacitation and acrosome reaction. We used to assess Ca^{2+} changes by chlortetracycline(CTC) patterns in the capacitation and acrosome reaction of human and hamster spermatozoa.

In the present applying quercetin which has been known as an ATPase antagonist, the enzymatic effect of Ca^{2+}-ATPase on capacitation and acrosome reaction was found to remarkable: a significant increase of the transformation from the original type to the B type and the AR type of spermatozoa. This finding suggests that Ca^{2+}-ATPase player an important role in the efflux and the influx of the Ca^{2+} which have been known to be an essential factor for the capacitation and acrosome reaction, and that the inhibitory action of the Ca^{2+}-ATPase might be a prerequsit step toward the capacitation and acrosome reaction.

In conclusion we reached can be introduced as follows: increment of the intracellular Ca^{2+} concentration occurred by controlling the slope of Ca^{2+} concentration through Ca^{2+}-ATPase activites in both the intracellular and extracellular fluid may be important procedures for the capacitation and the acrosome reaction, and finally for fertilization of the sperm and ovum.

서 론

포유동물의 경우 정자는 수정능 획득과정을 거쳐야만 난자와 수정을 할 수 있는데 이러한 생리적인 과정에는 여러 인자들이 작용하는 것으로 알려져 있고 그 중에서도 Ca^{2+}농도가 정자의 기능에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다(Yanagimachi & Usui, 1974).

세포외 Ca^{2+}이 정자의 기능에 있어 중요한 역할을 한다는 것은 1971년 Iwamatsu & Chang (1971)에 의해 처음 보고되었으며 많은 실험을 통하여 확인되어 왔다. 세포내 Ca^{2+}농도를 증가시켜 수정능 획득과 첨체반응을 일으키는데 세포외 Ca^{2+}의 내질화(internalization)가 필요하다고 알려져 있는데 생쥐 정자에 대한 실험에서 세포내, 외 Ca^{2+}농도가 완전한 수정에 이르기까지는 상당히 다른 기작 즉, 수정능 획득과정에서는 많은 양의 Ca^{2+}을 필요로 하지 않지만, 첨체반응과 수정과정에서는 더 많은 양의 Ca^{2+}을 필요로 한다고 보고되었으며 그때 분비되는 효소들과 막의 변화가 수정에 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌다(Fraser 1987b). 또한 정자의 운동성 즉, 생식도내 점액질의 환경에서 운동성을 보이거나 난자의 투명대를 통과하기 위해서도 Ca^{2+}을 필요로 한다고 알려지고 있는데(Yanagimachi, 1982), 포유동물 정자의 경우에는 반드시 수정전에 필요한 수정능 획득과정을 거쳐야만 하는데 이때 세포내 Ca^{2+}이 과활성을 유지시켜 첨체반응을 일으키게 한다고 보고되고 있으며, 다른 실험에 따르면 Ca^{2+}이 첨가되지 않은 배지에서 배양시키다 Ca^{2+}이 첨가된 배지에서 배양시키면 지속적으로 Ca^{2+}이 첨가된 배지에서 배양시킨 정자보다 수정능력이 떨어지고 부분적으로만 수정능력을 획득하게 된다고 보고되고 있다(Yanagimachi, 1982).

이러한 세포내, 외 Ca^{2+} 농도구배에는 막전위에 의해 농도구배가 조절되기 보다는 Ca^{2+}-ATPase와 Ca^{2+}-Na^{+}exchanger가 세포내 Ca^{2+}농도에 주요한 기능을 한다고 알려졌는데 특히 Ca^{2+}-ATPase의 기능에 대해 많은 연구가 행해지고 있다. Ca^{2+}-ATPase는 체세포(somatic cell)에서 세포막에 위치하고 있으며 Ca^{2+}을 세포외부로 배출하는 기능을 함으로써 세포내부의 Ca^{2+} 농도를 낮게 유지할 수 있도록 하는 기능을 담당하고 있는데 생쥐의 정자를 대상으로 행한 실험에서 Ca^{2+}-ATPase 활성을 저해시키는 물질을 투여하였을 때 수정능 획득시간이 짧아지는 사실로 미루어 볼 때 Ca^{2+}-ATPase 중요한 역할을 하는 것으로 나타났다(Fraser & McDermott, 1992).

본 실험은 chlortetracycline fluorescence 분석(Ward & Storey, 1984)을 이용하여 정자가 수정을 하기 위한 기능적인 능력이 Ca^{2+}과 관련된 변화와 얼마나 연관되어 있는가를 규명하고, 이러한 Ca^{2+}의 조절이 원형질막의 중요인자인 Ca^{2+}-ATPase와는 어떠한 연관성이 있으며 CTC 분석에 있어 사람과 햄스터 사이의 종(species)에 따른 차이점이 있는가를 알아보고자 한다.

재료 및 방법

배지 :

변형된 Tyrode's solution에 1.8 mM $CaCl_2$을 첨가시켜 배지로 사용하였다(Roldan *et al.*, 1986). Calcium-deficient medium은 $CaCl_2$을 첨가시키지 않고 만들고 존재하는 극미량의 Ca^{2+}(20 μℓ 이하)은 무시하고 측정하였다. 배지내 삼투압은 280 mosmol/kg로 조절하고 pH

7.5-8를 유지하여 사용하였다. 1.8 mM Ca^{2+}농도 용액을 만들기위해 22.5 mM $CaCl_2$ stock solution을 만든 후 230 μl Calcium-deficient medium에 stock solution 20 μl을 첨가하여 만들었다.

정자처리 :

사람의 정액은 건강한 남자에게서 수음을 통해 얻은 후 WHO의 기준에 따라 정액을 조사하여 사용하였다. 정액은 mini-percoll gradients(Ord *et al.*,1990)를 사용하여 처리하였다. 실온에서 5분동안 600 g에서 원심분리 후 상층액은 제거하고 정자괴에 새로운 배지를 첨가하여 다시 원심분리 시킨 후 다시 배지를 첨가한 후 5 % CO_2, 37 ℃에서 실험방법에 따라서 swim-up 시켰다. 정자농도는 haemocytometer를 이용하여 5 × 10^6/ ㎖로 조정하였고 이렇게 얻은 정자의 운동성은 대개 > 80 %를 보였다.

햄스터의 정자는 부정소에서 추출하여 정자농도를 약 3.5 × 10^7/ ㎖로 조절하였다.

Chlortetracycline 측정 :

측정방법은 Ward & Storey(1984)의 방법을 변형시켜 사용하였다. CTC 용액은 buffer(130 mM NaCl, 5 mM cysteine, 20 mM Tris-HCl, pH 7.8)에 750 μmol CTC를 넣어 준비하고 10 ℃, 암소에서 보관 후 사용하였다. 실온에서 깨끗한 slide glass에 10 μl씩 정자현탁액과 CTC 용액을 넣고 잘 혼합한 후 고정액으로 12.5 % paraformaldehyde를 0.8 μl 넣은 후 잘 혼합시킨다. Glycerol:PBS(9:1)에 녹인 0.22 mM 1,4,-diazabycyclo[2.2.2]-octane 한방울을 떨어뜨려 잘 섞은 후 cover glass를 덮고 mounting 시킨 후 즉각 관찰하거나 냉소에서 보관후 관찰하였다. 현미경은 phase contrast와 epicfluorescence가 장착된 Olympus BHS 현미경으로 관찰하였다. Hg excitation beam은 405 ㎚ band pass filter를 지나고 CTC fluorescence emission은 DM 455 dichroic mirror를 통해 관찰하였다.

각각의 sample에서 200개의 살아있는 정자를 관찰하여 다음과 같은 기준에 의거하여 분류하였다. 'F'는 두부에 일정한 형광을 띠고 있는 것으로 수정능획득이 일어나지 않고 첨체가 완전한 정자를 나타내고, 'B'는 후첨체 부위에 fluorescence-free band가 나타나는 것으로 수정능획득은 하였지만 첨체가 완전한 정자이고, 'AR'은 두부에 거의 형광을 띠고 있지 않는 것으로 수정능획득을 하였고 첨체반응이 일어난 것등으로 분류하였다(DasGupta & Fraser, 1991).

FITC-PSA 측정 :

Fluorescein isothiocyanate-conjugated *Pisum Sativum* agglutinin(PSA) stock 용액은 0.1 ㎎/㎖로 만들어 microcentrifuge tubes에 분주한 후 밀봉하여 -20 ℃에서 보관하였다. PSA로 측정할 정자현탁액은 600 g, 5 min동안 원심분리 시킨 후 정자괴를 냉장된 ethanol 50 ㎕로 다시 현탁시킨다. 이 현탁액은 4 ℃에서 30 min동안 배양시킨 후 slide glass에 10 ㎕를 채취하여 떨어뜨린 후 실온에서 건조시켰다. 여기에 PSA용액 5 ㎕를 떨구고 slide를 암소에서 보관하였다. 건조가 된 후 slide는 AnalaR water로 여러번 수세한 후 다시 4 ℃ 암소에서 보관한 후 DABCO 한방울을 떨군 후 cover glass를 덮고 관찰하였다. Hg excitation 범위는 450 - 490 ㎚로 정하고 FITC fluorescence emission은 RKP 510 beam splitting mirror를 사용하였다.

통계처리 :

결과는 Cochran's test(Snedecor & Cochran, 1980)와 student's t-test를 이용하여 분석하였다.

실험내용 및 결과

세포외 Ca^{2+} 농도에 따른 수정능획득과 첨체반응:

정자현탁액은 1.8 mM Tyrode's solution과 3.6 mM Tyrode's solution에서 3 hrs동안 배양 시킨 후 CTC 측정으로 AR형태를 관찰하였다. 1.8 mM Tyrode's solution에서 배양시킨 경우 B형의 세포는 60-70분경에 최고수치를 보이고 그 이후에는 큰 변화를 보이지는 않았다. AR형은 70분 이후에도 계속 증가추세를 보였는데 이러한 결과는 배양시 나타나는 일반적인 특징으로 생각된다(Yanagimachi, 1982; Roldan & Fleming, 1989). 3.6 mM Tyrode's solution에서는 60-70분을 전후해서 B형의 세포는 감소하는 반면에 AR형은 1.8 mM Tyrode's solution과 비교하여 급격히 상승하는 것을 관찰 할 수 있었다($P < 0.05$). 이러한 결과는 수정능 획득에 있어 세포외 Ca^{2+} 농도가 중요한 역할을 하고 있음을 보여주고 있다 (Table 1).

Calcium-deficient medium에서의 수정능 획득:

정자현탁액을 Calcium-deficient medium과 1.8 mM Tyrode's solution에서 배양시켰을 경우 B형은 변화를 보이지 않았으나 AR형은 180분 배양시켰을 경우 1.8 mM Tyrode's solution에서 유의적인 변화를 관찰 할 수 있었다($P < 0.05$). Fraser(1987)에 따르면 정자를 Ca^{2+}이 배제된 배지에서 배양시키다 1.8 mM Ca^{2+} 농도에서 재배양시킬 경우 Ca^{2+}이 포함된 배지에서 지속적으로 배양시킬 경우보다 AR형태가 급격히 줄어든다고 보고하고 있는데 본 실험에서도 유사한 결과를 얻을 수 있었다(Table 2).

FITC-PSA를 이용한 측정에서는 Ca^{2+}을 처리하였을 경우 운동성 있는 정자가 증가하는 것은 CTC 측정과 같은 양상을 보였으나 첨체반응율에 있어서는 CTC 측정과 비교하여 수치상으로는 낮게 나타났으나 유의적인 차이를 보이지는 않았다. B형과 AR형 모두에서 CTC 측정보다는 낮은 비율로 나타났고 특히 B형의 경우 유의적인 차이($P < 0.05$)를 볼 수 있었는데 capacitation 상태를 구별하는 차이점으로 판단되어졌다(Table 3).

Quercetin(Ca^{2+}-ATPase inhibitor) 존재시 수정능 획득:

DMSO에 20 mM quercetin(Sigma Chemical Co.) l^{-1}을 녹여 stock 용액을 만든 후, DMSO:0.9% NaCl(1:1)로 섞어 10 mM l^{-1}로 희석시킨후 분주하여 냉동보관하여 사용하였다. 실험에 사용하기 위하여 DMSO:0.9% NaCl을 이용하여 5, 2.5 mM substock 용액을 만든다. 여기에 quercetin 농도가 200, 100, 50 μmol l^{-1}로 되도록 정자현탁액(1/50 dilution)을 첨가한다. 대조군의 경우 DMSO 농도가 1 %가 되도록 한다. 5 hrs 경과 후 sample을 채취하여 분석한다($n = 4$). 사람 정자의 경우 첨체반응(AR형)은 3 hrs 이후 유의적인 증가($P < 0.05$)를 관찰 할 수 있었다. B형, AR형 모두 대체적으로 배양 후 3 hrs을 전후해서 유의적인 변화를 관찰 할 수 있었는데 이러한 변화는 수정능획득에 있어 Ca^{2+}이 개시인자로서 중요한

역할을 하는 시기라 사료된다(Table 4).

Quercetin은 정자의 운동성에는 별다른 영향을 주지는 않았고 대조군과 비교하여 배양초기에는 운동성이 다소 나아보였지만 장시간의 배양은 다른 보고(White *et al.*, 1990)와 마찬가지로 운동성을 저해하였다.

햄스터의 정자도 마찬가지로 첨체반응의 경우 실험초기에 유의적인 차이가 나타나지는 않았으나 3 - 4 hrs이 경과하면서 첨체반응이 유의적인 증가를 보였다. 그러나 운동성에는 사람 정자와 마찬가지로 뚜렷한 영향을 끼치지는 않는 것으로 나타났다(Table 5). 사람정자와 햄스터 정자 모두에 있어 첨체반응율(AR형)은 CTC 측정이나 FITC-PSA 측정을 시행하였을 때 큰 차이를 보이지는 않는 것으로 미루어 완전한 첨체반응이 일어나는 경우에는 AR형에는 큰 차이를 보이지는 않는다고 판단되어졌다.

고찰 및 결론

본 실험은 Ca^{2+}-ATPase가 수정능 획득과정에 있어서 어떠한 기능을 보이는가에 대해서 사람 정자와 햄스터의 정자를 대상으로 CTC fluorescence 방법을 통해 관찰하였다. 사람 정자의 경우 세포외 Ca^{2+}의 농도가 높을수록 수정능 획득을 유도하는 세포내 Ca^{2+} 농도가 증가하는 것으로 나타났다. 1.8 mM농도에서보다 3.6 mM 농도에서 같은 조건으로 배양시켰을 때 AR형이 증가되는 것으로 관찰되었다. 정자는 수정능 획득과정에서 세포내부로 Ca^{2+}의 유입이 증가되는데 이때 세포외부의 Ca^{2+}농도가 높을수록 세포내부의 Ca^{2+}농도가 증가하여 수정능획득이 일어나고 다음 첨체반응이 유발되는 것으로 보고되고 있다(Yanagimachi, 1982). 지금까지의 보고에 따르면 고농도의 세포외 Ca^{2+}농도에서 Ca^{2+}-ATPase의 활성을 저해시킴으로써 Ca^{2+}의 배출양보다 유입량이 증가할 경우 결과적으로 B형과 AR형으로 빠른 전환이 일어나도록 촉진하고 있으며 정자내부로 Ca^{2+}의 유입량이 많을수록 AR형으로 빠른 전환이 일어나는 것으로 알려져 있다.

그러나 CTC fluorescence 방법으로 관찰한 AR형의 정자가 수정능력에 얼마나 영향을 줄 수 있는가는 확실하지 않다. Fraser(1987b)에 따르면 수정능력이 있다고 판단되는 '첨체반응'이 일어난 정자를 전자현미경으로 관찰할 경우 상당히 증가한 것을 알 수 있었지만 일부는 죽었거나 변형된 정자가 발견된다고 보고하였고, White *et al.*(1990)는 정자 배양시 첨체반응율이 지금까지 보고와는 달리 높은 수치로 나타나지 않을 뿐만 아니라 수정과정에도 반드시 첨체반응이 필요한가에 대해서 회의적이라는 보고를 하고 있다. 그렇지만 본 실험의 결과로 볼 때 수정능 획득 동안 Ca^{2+}의 유입이 일정한 시간내에 이루어지고 있고 이러한 과정이 수정능 획득 과정으로의 전환을 유도하고 첨체반응을 유발시키고 있는 사실은 다른 저자들의 실험결과와 같은 결과로 나타났다(Aitken *et al.*, 1984; Fraser & McDermott, 1992).

Ca^{2+}의 유입과정에는 Ca^{2+}-ATPase와 Ca^{2+}-Na^{+} exchangers가 중요 기능을 담당하는 것으로 보고되고 있다. Ca^{2+}-ATPase는 세포의 원형질막에 위치하고 있고 Ca^{2+}을 배출함으로써 세포내부의 Ca^{2+}농도를 낮게 유지하는데 중요한 역할을 한다. 정자세포에도 Ca^{2+}-ATPase가 Ca^{2+}농도를 변화시켜 수정능획득에 중요한 기능을 한다고 알려져 있다(Roldan & Fleming, 1989). 본 실험에서는 Ca^{2+}-ATPase antagonist인 quercetin을 사용하여 Ca^{2+}-ATPase가 수정능 획득에 미치는 영향을 서로 다른 종(species)인 사람과 햄스터를 대상으로 관찰하였다.

Quercetin 50 - 200 μmol l^{-1}의 농도에서 B형과 AR형으로의 유의적인 증가가 관찰되었는데 이러한 결과는 Ca^{2+}-ATPase가 수정능 획득과정과 첨체반응에 있어 중요한 인자인 Ca^{2+}의 배출과 유입에 중요한 기능을 하고 있음을 뒷받침하고 있으며 Ca^{2+}-ATPase 기능을 저하시키는 과정이 사람과 햄스터 정자 모두에 있어 첨체반응에 중요한 생리적 단계라는 것을 암시하고 있다. 이전의 연구에 따르면 수정능 획득을 저해하는 인자가 존재하여 Ca^{2+}-ATPase의 활성을 증가시키는 것으로 알려져 왔는데(Fraser, 1984) 본 실험결과로 미루어 보아 이러한 저해인자를 제거하였을 경우 Ca^{2+}-ATPase가 비활성화되어 세포내 Ca^{2+} 농도를 높게 유지시켜 수정능 획득과정으로 빠르게 전환을 일으키는 것으로 판단된다. 즉, Ca^{2+} pump로 작용하는 Ca^{2+}-ATPase가 Ca^{2+} 농도에 중요한 기능을 하고 이러한 생리적 전환이 정자의 첨체반응에 중요한 단계로 작용하는 것이다. Quercetin은 Ca^{2+}-ATPase을 비활성으로 만들고 정자두부의 후첨체부위에 부착됨으로써 수정능 획득 여부를 판단 할 수 있는 것이다.

결론적으로 Ca^{2+}-ATPase는 세포내, 외 Ca^{2+}의 농도구배를 조절함으로써 세포내 Ca^{2+}의 농도를 증가시켜 정자가 수정능 획득과정으로 빨리 전환하도록 유도하고, 첨체반응에 중요한 역할을 하는 것으로 판단되며, 생리적 환경인자인 세포외 Ca^{2+}농도가 높게 유지될 경우에도 정자의 첨체반응이 유도되므로써 난자와 용이하게 수정을 할 수 있는 환경이 제공될 수 있다고 사료된다. 또한 본 실험에서 행한 사람 정자와 햄스터 정자 모두에 있어 CTC 측정과 FITC-PSA 측정시 완전하게 첨체반응이 일어났거나 첨체만응이 일어나지 않은 안전한 첨체를 가진 정자사이에서는 측정율에 차이가 크게 나타나지 않았으나 첨체만응이 일어나고 있는 B형에 있어서는 수치상의 차이를 관찰할 수 있었는데 이것은 PSA가 첨체기질 부위에 결합하여 나타나는 중간단계가 CTC 측정보다 감도의 차이로 수치상의 차이가 나타나는 것으로 사료된다.

인용문헌

Aitken RJ, Ross A, Hargreave T, Richardson D, Best F: Analysis of human sperm function following exposure to the ionophore A23187. *J Andrology* 1984, 5, 321-329

DasGupta S, Fraser LR: Ca^{2+}-related changes in the human sperm capacitation state assessed with chlortetracycline. *J Reprod Fertil* 1991, Abstract Series No.8.

Fraser LR: Potassium ions modulate expression of mouse sperm fertilizing ability, acrosome reaction and whiplash motility in vitro. *J Reprod Fertil* 1983, 69, 539-553.

Fraser LR: Mouse sperm capacitation *in vitro* involves loss of a surface-associated inhibitory component. *J Reprod Fertil* 1984, 72, 373-384.

Fraser LR: Minimum and maximum extracellular Ca^{2+} requirements during mouse sperm capacitation and fetilization in vitro. *J Reprod Fertil* 1987, 81, 77-89.

Fraser LR, McDermott CA: Ca^{2+}-related changes in the mouse sperm capacitation state: apossible role for a Ca^{2+}-ATPase. *J Reprod Fertil* 1992, 96, 363-377.

Iwamatsu T, Chang MC: Factors involved in the fertilization of mouse eggs *in vitro*. *J Reprod Fertil* 1971, 26, 197-208.

Lee MA, Trucco GS, Bechtol KS, Wummer N, Kopf GS, Blasco L, Storey BT: Capacitation and acrosome reactions in human spermatozoa monitored by a chlortetracycline fluorescence assay. *Fertil Steril* 1987, 48, 649-658.

Mortimer D: Sperm preparation techniques and iatrogenic failures of in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1991, 6, 173-178.

Mortimer D, Curtis EF, Camenzind AR: Combined use of fluorescent peanut agglutinin and Hoechst 33258 to monitor the acrosomal status and vitality of human spermatozoa. *Hum Reprod* 1990, 5, 99-104.

Ord T, Patrizio P, Marello E, Balmaceda JP, Asch RH: Mini-percoll: a new method of semen preparation for IVF in severe male factor infertility. *Human Reprod* 1990, 5, 987-989.

Roldan ERS, Fleming AD: Is a Ca^{2+}-ATPase involved in Ca^{2+} regulation during capacitation and the acrosome reaction of guinea-pig spermatozoa?. *J Reprod Fertil* 1989, 85, 297-308.

Roldan ERS, Shibita S, Yanagimachi R: Effect of Ca^{2+} channel antagonists on the acrosome reaction of guinea pig and golden hamster spermatozoa. *Gamete Res* 1986, 13, 281-292.

Ward DR, Storey BT: Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlortetracycline fluoresence assay. *Develop Biol* 1984, 104, 287-296.

White DR, Aitken RJ: Relationship between calcium, cAMP, ATP and intracellular pH and the capacity of hamster spermatozoa to express hyperactiviated motility. *Gamete Res* 1989, 22, 163-177.

White DR, phillips DM, Bedford JM: Factors affecting the acrosome reaction in human spermatozoa, *J Reprod Fertil* 1990, 90, 71-80.

Yanagimachi R: Requirements of extracellular calcium ions for various stages of fertilization and fertilization-related phenomena in the hamster. *Gamete Res* 1982, 5, 323-344.

Yanagimachi R, Usui N: Calcium dependence of the acrosome reaction and activation of guinea pig spermatozoa. *Expl Cell Res* 1974, 89, 161-174.

Table 1. Chlortetracycline(CTC) fluorescence patterns in human sperm suspensions incubated *in vitro* for 3h in medium containing either 1.8 mM or 3.6 mM Ca^{2+} l^{-1}.

Incubation time(min)	B type(%)		AR type(%)	
	1.8 mM	3.6 mM	1.8 mM	3.6 mM
30 mins	13.5 ± 1.3	16.5 ± 1.0	14.0 ± 2.2	23.3 ± 3.0
60 mins	18.8 ± 1.0	20.5 ± 1.3	21.5 ± 1.3	44.3 ± 2.5*
120 mins	10.8 ± 1.3	11.5 ± 2.6	32.8 ± 2.1	47.0 ± 3.6
180 mins	8.5 ± 1.3	7.3 ± 1.3	35.5 ± 2.4	47.0 ± 1.8

Results are mean ± s.d. of at least 4 experiments.
Compared with corresponding 1.8 mM Ca^{2+} suspensions: $^{*}P < 0.05$

Table 2. Chlortetracycline(CTC) fluorescence patterns in human sperm suspensions incubated for 3h in medium without(-Ca^{2+}) and with 1.8 mM Ca^{2+} l^{-1}.

Incubation time(min)	B type(%)		AR type(%)	
	-Ca^{2+}	+Ca^{2+}	-Ca^{2+}	+Ca^{2+}
30 mins	12.0 ± 1.2	12.5 ± 2.0	14.5 ± 2.1	14.0 ± 2.2
60 mins	10.0 ± 0.8	15.5 ± 4.1	16.3 ± 2.2	21.8 ± 1.0
120 mins	8.5 ± 2.4	11.3 ± 1.7	13.0 ± 3.2	32.0 ± 1.4*
180 mins	7.5 ± 1.0	11.0 ± 0.8	13.8 ± 2.5	36.3 ± 1.0*

Results are mean ± s.d. of 4 experiments.
Compared with -Ca^{2+} suspensions: $^{*}P < 0.05$

Table 3. Acrosomal status in human sperm suspensions incubated for 20hr in calcium deficient medium and then receving 1,8 mM $Ca^{2+}l^{-1}$ and then evaluated with FITC-PSA.

Incubation time(hr)	No. of samples	acrosome loss(%)	acrosome intact(%)
5hrs + Ca^{2+}	10	6.7 ± 0.6	88.7 ± 1.5
5hrs - Ca^{2+}	10	7.2 ± 2.6	87.6 ± 1.8
20hrs + Ca^{2+}	10	13.5 ± 3.8	70.9 ± 3.4[a]
20hrs - Ca^{2+}	10	9.1 ± 1.4	85.2 ± 2.1[b]

Results are mean ± s.d. of 4 experiments.

a, b : different subscripts denote significantly differences ($P < 0.05$)

Table 4. Chlortetracycline(CTC) pattern(B type) in human sperm suspensions incubated for 5h in different concentrations of quercetin.

	Incubation time(hr)				
	1hr	2hrs	3hrs	4hrs	5hrs
Control	4.8 ± 1.5	10.3 ± 1.0	12.0 ± 1.4	18.5 ± 4.4	22.0 ± 3.4
50 μl	11.0 ± 0.8	17.8 ± 1.0	21.0 ± 0.8	25.0 ± 1.4	32.5 ± 1.3
100 μl	13.5 ± 0.6	20.5 ± 2.9	26.8 ± 2.1	29.3 ± 1.7	37.8 ± 2.5
200 μl	16.3 ± 1.0	24.3 ± 1.9	31.8 ± 1.5	33.8 ± 2.5	42.6 ± 2.9

Results are mean ± s.d. of 4 experiments.

Cmpared with controls: $P < 0.05$

Table 5. Comparison of chlortetracycline(CTC) pattern(AR type) and fluorescein isothiocyanate-conjugated Pisum Sativum agglutinin(FITC-PSA) assessments in human and hamster sperm suspensions incubated for 5h in different concentrations of quercetin.

	FITC-PSA		CTC	
	Human(5hr)	Hamster(5hr)	Human(5hr)	Hamster(5hr)
Control	22.3 ± 3.5	27.2 ± 1.8	25.0 ± 1.8	30.2 ± 3.3
50 μℓ	27.8 ± 2.1	29.5 ± 2.1	31.3 ± 1.7	29.2 ± 1.2
100 μℓ	32.3 ± 1.7	37.0 ± 2.2	34.3 ± 2.7	40.7 ± 2.1
200 μℓ	40.3 ± 1.7	46.1 ± 1.8	42.4 ± 4.2	47.1 ± 6.2

Results are mean ± s.d. of 4 experiments.

Compared with controls: $P < 0.05$