

The effect of Equex STM paste and post-thaw dilution rates on sperm survival after thawing of frozen cat spermatozoa in straws

Kaywalee Chatdarong* and Chainarong Lohachit

Department of Obstetrics, Gynaecology and Reproduction, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Pathumwan, Bangkok 10330

Abstract

Spermatozoa are exposed to the potential of lysis due to ice crystal formation as well as to osmotic stress during freezing and thawing. The objective was to evaluate if post-thaw dilution or thawing temperature would affect quality and longevity of ejaculated cat spermatozoa. Six ejaculates were obtained from each of six male cats with 2 weeks interval. The semen from each ejaculate was frozen in four of half filled 0.25 mL straws. Straws were thawed 1) at 37 °C for 15 s and diluted with 0.25 mL Tris buffered, 2) at 37 °C for 15 s without dilution, 3) at 70 °C for 6 s and diluted with 0.25 mL Tris buffered, 4) at 70 °C for 6 s without dilution. Sperm motility, progressive motility, membrane integrity (SYBR-14/EthD-1 staining) and acrosome integrity (FITC-PNA/PI staining) were evaluated after collection and at times 0, 2, 4 and 6 hours post-thaw. The different treatments were analysed with GLM and pairwise comparisons were made with a paired t-test. At time 0, mean motility ranged between 59.2 ± 11.1 and $65.4 \pm 11.2\%$, mean progressive motility between 3.6 ± 0.5 and 4.1 ± 0.4 , mean membrane integrity between 63.8 ± 8.8 and $65.1 \pm 14.7\%$, and mean acrosome intact between 39.6 ± 22.1 and $47.7 \pm 20.2\%$ for the different treatments. Thawing at 70°C for 6 s resulted in the best motility compared to the others ($P < 0.05$). Regardless of the different thawing temperatures, post-thaw dilution significantly improved motility, progressive motility and acrosome integrity ($P < 0.05$). Membrane integrity did not differ significantly between treatments. Equex STM paste can be used successfully as a cryoprotectant for ejaculated cat spermatozoa without deleterious sperm longevity. With the freezing protocol used in this study, it is preferable to thaw frozen ejaculated cat spermatozoa at 70 °C for 6 s. A post-thaw dilution with Tris buffered solution is favourable to sperm motility and acrosome integrity.

Keywords: feline, freezing, semen

*Corresponding author: Tel. 0-2218-9644, Fax. 0-2252-0738
E.mail: Kaywalee.C@Chula.ac.th

ผลของอีเควิกซ์ เอสทีเอ็ม เพสท์ และการเจือจางน้ำเชื้อต่อการมีชีวิตของตัวอสุจิหลัง การละลายน้ำเชื้อแช่แข็งในหลอดพลาสติกในแมวบ้าน

เกวลี ฉัตรตรงค์* และ ชัยณรงค์ โลหิต

ภาควิชาสัตวศาสตร์ สาขาวิชา และวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

บทคัดย่อ

ในขณะที่ทำการแช่แข็งและละลายน้ำเชื้อ ตัวอสุจิมีความเสี่ยงต่อการถูกทำลายโดยการผลึกน้ำแข็ง และจากการเปลี่ยนแปลงออสโมลาริตี การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบผลของอุณหภูมิและการใช้สารเจือจางในการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งต่อคุณภาพและการมีชีวิตของตัวอสุจิแมวที่ได้จากการหลั่งน้ำเชื้อ ทำการรีดเก็บน้ำเชื้อแมวจำนวน 6 ตัว ตัวละ 6 ครั้ง ห่างกัน 2 สัปดาห์ นำน้ำเชื้อผ่านกระบวนการแช่แข็งในหลอดพลาสติกขนาด 0.25 มิลลิลิตรจำนวน 4 หลอดต่อน้ำเชื้อที่ได้จากการหลั่งแต่ละครั้ง ละลายน้ำเชื้อแช่แข็งในอ่างอุ่น 1) ที่ 37 องศาเซลเซียส 15 วินาที และเจือจางด้วยน้ำยาทริสบัฟเฟอร์ 0.25 มิลลิลิตร 2) ที่ 37 องศาเซลเซียส 15 วินาที โดยไม่เจือจาง 3) ที่ 70 องศาเซลเซียส 6 วินาที และเจือจางด้วยน้ำยาทริสบัฟเฟอร์ 0.25 มิลลิลิตร 4) ที่ 70 องศาเซลเซียส 6 วินาที โดยไม่เจือจาง ตรวจสอบการเคลื่อนไหวตัวอสุจิ การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ความสมบูรณ์ของผนังเซลล์ (โดยใช้สีย้อมไซเบอร์-14 และ เอทิดีเอ็ม-1) และความสมบูรณ์ของอะโครโซม (โดยใช้สีย้อมฟิทซี-พีเอ็นเอ และโพพติเคียมไอโอไดด์) หลังการเก็บน้ำเชื้อ และ ที่ 0 2 4 และ 6 ชั่วโมง หลังละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง วิเคราะห์ความแตกต่างของข้อมูลโดยใช้สถิติแอลเอ็ม และเปรียบเทียบข้อมูลโดยใช้การทดสอบแบบจับคู่ ที่เวลา 0 ชั่วโมง ตัวอสุจิหลังละลายด้วยวิธีต่าง ๆ มีความเคลื่อนไหวเฉลี่ยร้อยละระหว่าง 59.2 ± 11.1 และ 65.4 ± 11.2 การเคลื่อนไหวไปข้างหน้าเฉลี่ยระหว่าง 3.6 ± 0.5 และ 4.1 ± 0.4 ความสมบูรณ์ของผนังเซลล์เฉลี่ยร้อยละระหว่าง 63.8 ± 8.8 และ 65.1 ± 14.7 และความสมบูรณ์ของอะโครโซมเฉลี่ยร้อยละระหว่าง 39.6 ± 22.1 และ 47.7 ± 20.2 การละลายที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วินาที ให้ผลร้อยละของการเคลื่อนไหวตัวอสุจิมากที่สุด ($P < 0.05$) การละลายน้ำเชื้อแช่แข็งโดยใช้สารเจือจางให้ผลการเคลื่อนไหวตัวอสุจิ การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และความสมบูรณ์ของอะโครโซมดีขึ้นในทุกอุณหภูมิที่ละลาย ($P < 0.05$) แต่ไม่มีความแตกต่างของความสมบูรณ์ของผนังเซลล์ อีเควิกซ์ เอสทีเอ็ม เพสท์ สามารถใช้เป็นสารป้องกันตัวอสุจิแมวที่ได้จากการหลั่งน้ำเชื้อในกระบวนการแช่แข็งได้ โดยไม่มีผลลบต่อการมีชีวิตของตัวอสุจิ กล่าวโดยสรุป หากจะใช้วิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อในการศึกษานี้ ควรใช้การละลายที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วินาที โดยทำการเจือจางน้ำเชื้อขณะละลายด้วยสารละลายทริสบัฟเฟอร์ จะช่วยให้การเคลื่อนไหวของตัวอสุจิตีขึ้นและอะโครโซมถูกทำลายน้อยลง

คำสำคัญ: แมว การแช่แข็ง น้ำเชื้อ

*ผู้รับผิดชอบบทความ โทร. 0-2218-9644 โทรสาร 0-2252-0738

อีเมลล์ Kaywalee.C@Chula.ac.th