MRG4780201 ผศ.สพ.ญ.ดร.เกวลี ฉัตรดรงค์

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: **ผลของ Equex STM paste และการเจือจางน้ำเชื้อต่อการมีชีวิตของตัวอสุจิหลังการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งในหลอดพลาสติคในแมวบ้าน *(Felis catus)***

โดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สพ.ญ.ดร.เกวลี ฉัตรดรงค์

กันยายน 2549

สัญญาเลขที่ MRG4780201

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: ผลของ Equex STM paste และการเจือจางน้ำเชื้อต่อการมีชีวิตของตัวอสุจิหลังการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งในหลอดพลาสติคในแมวบ้าน *(Felis catus)*

คณะผู้วิจัย	สังกัด
1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สพ.ญ.ดร.เกวลี ฉัตรดรงค์	คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2. รองศาสตราจารย์ น.สพ.ดร.ชัยณรงค์ โลหชิต	คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

MRG4780201

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 thwing 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 analyse 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 ± 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 ± 14.7%, and mean acrosome intact between 39.6 ± 22.1 and 47.7 ± 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 และการเจือจางน้ำเชื้อต่อการมีชีวิตของตัวอสุจิหลังการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งในหลอดพลาสติคในแมวบ้าน

เกวลี ฉัตรดรงค์* และ ชัยณรงค์ โลหชิต

ภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยา และวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

บทคัดย่อ

ในขณะทำการแช่แข็งและละลายน้ำเชื้อ ตัวอสุจิมีความเสี่ยงต่อการถูกทำลายโดยการผลึกน้ำแข็งและจากการเปลี่ยนแปลงออสโมลาริตี้ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบผลของอุณหภูมิและการใช้สารเจือจางในการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งต่อคุณภาพและการมีชีวิตของตัวอสุจิแมวที่ได้จากการหลั่งน้ำเชื้อ ทำการรีดเก็บน้ำเชื้อแมวจำนวน 6 ตัว ตัวละ 6 ครั้ง ห่างกัน 2 สัปดาห์ นำน้ำเชื้อผ่านกระบวนการแช่แข็งในหลอดพลาสติคขนาด 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 ตรวจการเคลื่อนไหวตัวอสุจิ การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ความสมบูรณ์ของผนังเซลล์ (โดยใช้สีย้อมไซเบอร์-14 และ เอทธิเดียม-1) และความสมบูรณ์ของอะโครโซม (โดยใช้สีย้อมฟิทซี-พีเอ็นเอ และโพพิเดียมไอโอไดด์) หลังการเก็บน้ำเชื้อ และ ที่ 0 2 4 และ 6 ชั่วโมง หลังละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง วิเคราะห์ความแตกต่างของข้อมูลโดยใช้สถิติจีแอลเอ็ม 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 และความสมบูรณ์ของอะโครโซมดีขึ้นในทุกอุณหภูมิที่ใช้ละลาย ($P < 0.05$) แต่ไม่มีความแตกต่างของความสมบูรณ์ของผนังเซลล์ อีเควิกซ์ เอสทีเอ็ม เพสท์ สามารถใช้เป็นสารป้องกันตัวอสุจิแมวที่ได้จากการหลั่งน้ำเชื้อในกระบวนแช่แข็งได้โดยไม่มีผลลบต่อการมีชีวิตของตัวอสุจิ กล่าวโดยสรุป หากจะใช้วิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อในการศึกษานี้ ควรใช้การละลายที่อุณภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วินาที โดยทำการเจือจางน้ำเชื้อขณะละลายด้วยสารละลายทริสบัฟเฟอร์ จะช่วยให้การเคลื่อนไหวของตัวอสุจิดีขึ้นและอะโครโซมถูกทำลายน้อยลง

คำสำคัญ: แมว การแช่แข็ง น้ำเชื้อ

*ผู้รับผิดชอบบทความ โทร. 0-2218-9644 โทรสาร 0-2252-0738
อีเมลล์ Kaywalee.C@Chula.ac.th

5. ระยะเวลาดำเนินงาน เดือนกรกฎาคม 2547 ถึง เดือนมิถุนายน 2549

(ได้รับอนุมัติให้ขยายเวลา3 เดือน เนื่องจากลาคลอดบุตร เป็นเดือนกันยายน 2549 ตามหนังสือที่ นร 6808/175/2549 ลงวันที่ 4 เมษายน 2549)

6. ได้เสนอโครงการนี้ หรือโครงการที่มีส่วนเหมือนกับเรื่องนี้บางส่วน เพื่อขอทุนต่อแหล่งทุนอื่นที่ใดบ้าง

☑ ไม่ได้เสนอต่อแหล่งทุนอื่น

☐ เสนอต่อ.....

ชื่อโครงการที่เสนอ.....

กำหนดทราบผล (หรือสถานสภาพที่ทราบ).....

7. ปัญหาที่ทำการวิจัย และความสำคัญของปัญหา

แมวบ้านเป็นต้นแบบในการศึกษาด้านระบบสืบพันธุ์ของสัตว์ป่าตระกูลแมวอื่น ๆ เพราะมีสรีรวิทยาของระบบสืบพันธุ์ที่พัฒนามาใกล้เคียงกัน (Wildt et al., 1986) โดยจะเห็นได้จากความสำเร็จของการผสมเทียมเสือชีต้าร์ *(Acinonyx jubatus)* (Howard et al., 1992) เสือไซบีเรียน *(Panthera tigris altaicia)* (Donoghue et al., 1993) เสือพูม่า *(Felis concolor)* (Barone et al., 1994) และเสือลายเมฆ *(Neofelis nebulosa)* (Howard et al., 1996) โดยใช้เทคนิคที่พัฒนามาจากการผสมเทียมในแมวบ้าน (Howard et al., 1992) ในบรรดาสัตว์ตระกูลแมว (Felidae) 38 ชนิด เป็นสัตว์ป่าหายาก (endangered species) ที่พบในประเทศไทย 9 ชนิด คือ เสือโคร่ง *(Panthera tigris)* เสือดาว *(Panthera pardus)* เสือลายเมฆ *(Neofelis nebulosa)* เสือไฟ *(Felis temmincki)* เสือปลา *(Felis viverrina)* แมวดาว *(Felis bengalensis)* แมวป่าหรือเสือกระต่าย *(Felis chaus)* แมวป่าหัวแบน *(Felis planiceps)* และแมวลายหินอ่อน *(Felis marmorata)* โดยในธรรมชาติไม่มีผู้พบเห็นแมวป่า แมวป่าหัวแบน และแมวลายหินอ่อนมาเป็นเวลานานแล้ว (ศลิษาและอลัน 2538) จึงได้รับการประกาศให้เป็นสัตว์ป่าสงวน ตามพระราชบัญญัติสงวนและคุ้มครองสัตว์ป่า ฉบับปี พ.ศ. 2535 สำหรับสัตว์ป่าตระกูลแมวส่วนใหญ่ ห้ามทำการซื้อขายหรือนำเข้าออกนอกราชอาณาจักรตามสนธิสัญญาว่าด้วยการค้าสัตว์ป่านานาชาติ (The Convention on International Trade in Endangered Species, CITES)

(CITES, 2000) จึงเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้สัตว์ป่าซึ่งมีจำนวนน้อยมีการผสมพันธุ์เลือดชิดทั้งในกรงเลี้ยงและในป่า มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมต่าง ๆ ที่สำคัญได้แก่ ลักษณะผิดปกติของตัวอสุจิจำนวนมากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ในการหลั่งน้ำเชื้อหนึ่งครั้ง ซึ่งพบในกลุ่มประชากรแมวบ้านและสัตว์ป่าตระกูลแมวอื่น ๆ บางชนิด (teratospermic cats) ที่อยู่อาศัยในพื้นที่จำกัด (Howard et al., 1996; Pukazhenthi et al., 2001) ตัวอสุจิจากสัตว์เหล่านี้จะมีความทนทานต่อความเย็นและออสโมลาลิตี้ต่ำกว่าตัวอสุจิของสัตว์ที่มีการหลั่งจากน้ำเชื้อปกติ (normospermic cats) ซึ่งมีผลต่อการเก็บรักษาและการผสมติด (Pukazhenthi et al., 1999; Pukazhenthi et al., 2000)

นอกจากแมวบ้านจะมีความสำคัญในแง่ของการเป็นตัวแทนในการศึกษาโรคและความผิดปกติในคน และการศึกษาสรีรวิทยาการสืบพันธุ์สัตว์ป่าตระกูลแมวแล้ว แมวบ้านยังเป็นสัตว์เลี้ยงที่ได้รับความนิยมสูงรองจากสุนัข เพราะเลี้ยงได้ในที่อยู่อาศัยที่มีพื้นที่จำกัด ดังจะเห็นได้จากความนิยมแมวสายพันธุ์แท้ โดยเฉพาะแมวไทย 4 ชนิด ได้แก่ แมวสีสวาด แมววิเชียรมาศ แมวขาวมณี และแมวศุภลักษณ์ ซึ่งมีชื่อเสียงในเรื่องความโดดเด่นของสายพันธุ์ไปทั่วโลก อย่างไรก็ตาม ประชากรแมวที่ใช้ในการทดลอง แมวป่า และแมวพันธุ์แท้เหล่านี้มีจำนวนจำกัด การใช้เทคโนโลยีทางวิทยาการสืบพันธุ์โดยการเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยการแช่แข็ง จึงมีประโยชน์ในด้านการเพิ่มจำนวนสัตว์ รวมถึงการกระจายพันธุกรรมเพื่อเพิ่มความหลากหลายของยีน (genetic diversity) ในหมู่สัตว์ที่อาศัยในพื้นที่เดียวกัน อันเป็นเป้าหมายสำคัญในการอนุรักษ์สัตว์ป่าใกล้สูญพันธุ์ แมวเลี้ยงพันธุ์แท้ และแมวที่มีพันธุกรรมที่ใช้เป็นต้นแบบในการทดลองความผิดปกติในคน

การศึกษาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อรวมทั้งการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งในสัตว์เหล่านี้ เพื่อให้ตัวอสุจิหลังการละลายมีชีวิตอยู่นาน เป็นการเพิ่มโอกาสการผสมติด เพราะกระบวนการแช่แข็งทำให้เกิดการลดลงของความเคลื่อนไหว การทำลายของผนังหุ้มเซลและอะโครโซมของตัวอสุจิอย่างมาก จึงลดระยะเวลาการมีชีวิตอยู่ของตัวอสุจิที่พร้อมปฏิสนธิ (Wood et al., 1993; Hay and Goodrowe, 1993; Pukazhenthi et al., 1999) ในขณะที่ช่วงเวลาการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งที่เหมาะสมกับการตกไข่หลังการกระตุ้นโดยฮอร์โมนเอชซีจี (human chorionic gonadotrophin, hCG) ในแมวยังไม่มีการรายงานที่แน่ชัด และยังแนะนำให้ทำการผสมเทียมถึงสองครั้ง คือในวันที่ฉีดฮอร์โมนเอชซีจี และอีกสองวันถัดมา (Axnér and Linde-Forsberg, 1998) ซึ่งเป็นการสิ้นเปลืองน้ำเชื้อ และถ้าเป็นในสัตว์ป่าจะต้องทำการวางยาสลบถึงสองครั้งซึ่งเป็นการเสี่ยง ดังนั้นการมีชีวิตอยู่นานของตัวอสุจิหลังการละลายจึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง

8. วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาผลของ Equex STM paste ซึ่งเป็นสารดีเทอร์เจ้น (detergent) ในการป้องกันการทำลายตัวอสุจิแมวจากกระบวนการแช่แข็ง
2. เพื่อหาระยะเวลาการมีชีวิตและคุณภาพของตัวอสุจิหลังการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งโดยการใช้และไม่ใช้น้ำยาเจือจางที่อุณหภูมิ 37 และ 70 องศาเซลเซียส

9. ระเบียบวิธีวิจัย

สัตว์ทดลอง

แมวบ้าน *(Felis catus)* เพศผู้โตเต็มวัย จำนวน 6 ตัว มีสุขภาพแข็งแรงสมบูรณ์ มีคุณภาพน้ำเชื้อเป็นปกติ โดยดูจากการเคลื่อนไหวตัวอสุจิมากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนตัวอสุจิลักษณะปกติมากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ต่อการหลั่งน้ำเชื้อหนึ่งครั้ง เลี้ยงแมวในกรงเลี้ยงเดี่ยวมีพื้นที่ไม่น้อยกว่า 1 x 1.5 เมตรต่อตัว ได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูปวันละ 1 ครั้ง และมีน้ำให้กินตลอดเวลา การเลี้ยงแมวและการทดลองผ่านการอนุญาตจากคณะกรรมการพิจารณาการใช้สัตว์ทดลอง ฝ่ายวิจัยและบริการทางวิชาการ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีทดลอง

การรีดเก็บน้ำเชื้อแมวจำนวน 6 ตัว ตัวละ 6 ครั้ง ห่างกัน 2 สัปดาห์ โดยใช้เครื่องกระตุ้นไฟฟ้า นำน้ำเชื้อผ่านกระบวนการแช่แข็งในหลอดพลาสติคขนาด 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 ตรวจการเคลื่อนไหวตัวอสุจิ การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ความสมบูรณ์ของผนังเซลล์ (โดยใช้สีย้อมไซเบอร์-14 และ เอทธิเดียม-1) และความสมบูรณ์ของอะโครโซม (โดยใช้สีย้อมฟิทซี-พีเอ็นเอ และโพพิเดียมไอโอไดด์) หลังการเก็บน้ำเชื้อ และ ที่ 0 2 4 และ 6 ชั่วโมง หลังละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง วิเคราะห์ความแตกต่างของข้อมูลโดยใช้สถิติจีแอลเอ็ม และเปรียบเทียบข้อมูลโดยใช้การทดสอบแบบจับคู่

10. ผลการทดลอง

ผลการทดลองพบว่าที่เวลา 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 และความสมบูรณ์ของอะโครโซมดีขึ้นในทุกอุณหภูมิที่ใช้ละลาย ($P < 0.05$) แต่ไม่มีความแตกต่างของความสมบูรณ์ของผนังเซลล์ อีเควีกซ์ เอสทีเอ็ม เพสท์ สามารถใช้เป็นสารป้องกันตัวอสุจิแมวที่ได้จากการหลั่งน้ำเชื้อในกระบวนแช่แข็งได้ โดยไม่มีผลลบต่อการมีชีวิตของตัวอสุจิ

11. สรุป

หากจะใช้วิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อในการศึกษานี้ ควรใช้การละลายที่อุณภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วินาที โดยทำการเจือจางน้ำเชื้อขณะละลายด้วยสารละลายทริสบัฟเฟอร์ จะช่วยให้การเคลื่อนไหวของตัวอสุจิดีขึ้นและอะโครโซมถูกทำลายน้อยลง

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 analyse 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 ± 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 ± 14.7%, and mean acrosome intact between 39.6 ± 22.1 and 47.7 ± 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

Introduction

Except for the domestic cat (*Felis catus*) and a few other felid species, the Felidae are listed as threatened by the Convention on International Trade in Endangered Species (CITES, 2000). Among nine species of felid in Thailand, one (*Felis marmorata*) is considered nearly extinct. The other eight species (*Panthera tigris, Panthera pardus, Neofelis nebulosa, Felis temmincki, Felis viverrina, Felis bengalensis, Felis chaus* and *Felis planiceps*) are deemed highly in risk of extinction. Cryopreservation of spermatozoa allows the preservation of genetic material from endangered wild species. Because wild felids are in risk of extinction, the domestic cat has been used as a model of these wild species for reproductive studies (Wild et al., 1986).

Cryopreservation induces a series of osmotic, chemical, and mechanical stresses to sperm, causing death of some spermatozoa, membrane and acrosome disruptions, and reducing fertility ability as a consequence (Watson, 1995). Several cryoprotocols have been experimented with the ultimate goal to minimize damages in cat spermatozoa (Platz et al., 1978; Wood et al., 1993; Lengwinat and Blottner, 1994; Zambelli et al., 2002; Axnér et al., 2004). During freezing and thawing, the spermatozoon is exposed to non-physiological concentrations of extracellular solutes. Addition and removal of cryoprotectant has been reported as the major factor altering cellular volume excursions during freezing process and subsequently causing sperm damages (Gao et al., 1997). During

addition, the spermatozoon transiently shrinks (loss of intracellular water across an osmotic gradient) and then returns to its near original volume upon cryoprotectant intracellular permeation (Gao et al., 1997). Significant volume change also occurs at thawing when the cell exchanges intracellular cryoprotectant for re-entry of water (Gao et al., 1995, Gao et al., 1997). Furthermore, the spermatozoon is exposed to the potential of lysis due to ice crystal formation during freezing and thawing. All these fators can stress and perturb the morphological architecture of the spermatozoon, disrupting membranes, the motility apparatus and survival itself. However, a proportion of rapidly cooled cells can be rescued by rewarming rapidly and slowly cooled cells can be rescued by rewarming slowly thus limiting the time for recrystallization to oocur (Mazur, 1984). Slow dilution after thawing prevents the sharp change in osmolarity and viscosity between the cryopreservation solution and diluent (Nakagata and Tadeshima, 1992).

Addition of Equex STM paste to a Tris extender has been reported to improve post-thaw viability, motility, acrosome integrity and longevity of frozen-thawed dog spermatozoa (Rota et al., 1997; Peña and Linde-Forsberg, 2000). In cat, Equex has a positive effect on the acrosomes but has a negative effect on the longevity of the epididymal spermatozoa after thawing (Axnér et al., 2004). However, ejaculated and epididymal spermatozoa have different membrane characteristics which may result in different susceptibility for cold shock (White, 1993). This study aimed to find the optimal temperature and condition for thawing frozen ejaculated cat spermatozoa.

Materials and methods

Animals

Six male cats aged 1-2 years, weighed 4-6 kg, were kept in individual stainless steel cages measuring 1.5x1.5x1.8 m (WxLxH) located in a confined room. The cats were provided the ambient light from the windows, a commercial feline diet (Science diet, Hill's Pet Nutrition Inc, USA) and free access to water.

Semen collection

Generalized anesthesia was induced using single bolus of 10 mg/kg of propofol (Fresofol 1%; Fresenius Kabi Austria GmbH, Graz, Austria) intravenously (Chatdarong et al., 2006). Electroejaculation was performed in the cats using a previously described protocol (Howard et al., 1986), consisting of a total of 80 stimuli (2-5 V) divided into three series, delivered through a rectal probe (1.3 cm diameter, 24 cm length) and an electrostimulator (AC, 60-Hz sine wave; PT Electronics, Boring, OR, USA). Ejaculate was immediately diluted 1:1 in Tris buffered solution. Aliquots of the sample were evaluated for sperm quality. Six ejaculates were obtained from each six male cats at 2 weeks interval.

Evaluation of sperm concentration and morphology

To determine sperm concentration, a 5 μL aliquot of the sample at room temperature was diluted in 200 μL of formol-saline and spermatozoa were counted in 25 squares of a haemocytometer chamber. For evaluation of sperm morphology, the combined use of wet smears and stained smears was used since abnormal sperm heads require different evaluation techniques than do other sperm abnormalities to get the most accurate counts of all sperm defects (Sekoni et al., 1981). Two hundred spermatozoa in the formol-saline were evaluated under a phase-contrast microscope at 1000x magnification. Morphology of the sperm heads was evaluated separately by counting 500 spermatozoa on carbol-fuchsine stained smears under a light microscope at 1000x magnification.

Evaluation of motility, membrane integrity and acrosome integrity

To evaluate sperm motility and progressive motility (scale of 0-5; Platz and Seager, 1978), an aliquot of the sperm sample was placed on a warm slide at 38 °C and a minimum of four fields were evaluated subjectively under a phase-contrast microscope at 200x. Plasma membrane integrity was evaluated with a combination of the fluorophores EthD-1 and SYBR-14 (Molecular probes Inc., OR, USA). Aliquots of 5 μL sperm suspension were mixed with 1 μL 0.38 μM SYBR-14 in DMSO (final concentration 0.054 μM) and 1 μL 14 μM EthD-1 in PBS (final concentration 2 μM) and

incubated in the dark at 37 °C for 30 min. Samples were evaluated with an epifluoresent microscope. A total of 200 spermatozoa were evaluated from each sample. Live spermatozoa stained green with SYBR-14 while dead spermatozoa stained red with EthD-1. Some moribound spermatozoa stained with both red and green were not reported. A fluorescein isothiocyanate conjugated peanut agglutinin (FITC-PNA, Sigma, St.Louis, USA) stain was used. A 5 µL sperm suspension was smeared onto a micro-slide, and then sperm membranes were permeabilized with 95% ethanol for 30 s. After mixing 90 µL FITC-PNA (100 µg/mL in PBS) with 5 µL propidium iodide (PI, 340 µM in PBS, final concentration 18 µM), 20 µL of this mixture was spread over each smear. The slides were incubated in a moist chamber at 4 °C for 30 min then rinsed with 4 °C distilled water and air dried at 4 °C. The slides were evaluated using epifluoresent microscopy under a glycerine solution. Propidium iodide was used as a counterstain to give a better visualization of the spermatozoa. Two hundred spermatozoa were assessed in each smear and classified into three categories based on their FITC-PNA patterns (Cheng et al., 1996). Briefly, the acrosome region of sperm head displaying bright fluorescence was defined as intact acrosome. The acrosome region of sperm head displaying disrupted, patchy image of fluorescence was defined as reacted acrosome. The sperm head displaying equatorial segment was defined as acrosome loss.

Media used for freezing and thawing

The sperm-freezing media consisted of two formulas of extender. Extender 1 contained 2.4% (w/v) Tris (Fluka, Buenos Airez, Argentina), 1.4% (w/v) citric acid (Fluka, Buenos Airez, Argentina), 0.8% (w/v) glucose (BDH, VWR International, Poole, England), 3% (v/v) glycerol (Fluka, Buenos Airez, Argentina), 20% (v/v) egg yolk, 0.06% (w/v) Na-benzylpenicillin (M&H Manufacturing, Samudprakan, Thailand), 0.1% (w/v) streptomycin sulphate (M&H Manufacturing, Samudprakan, Thailand) in distilled water (pH 6.5, 833 mOsm). Extender 2 had the same omposition as that of Extender 1 except that it contained 7% glycerol (v/v) and 1% (v/v) Equex STM paste (Nova Chemical Sales, Scituate, Inc., MA, USA) (pH 6.5, 1630 mOsm). The thawing medium (Tris buffered) had the same composition as Extender 1 except that it did not contain egg yolk or glycerol (pH 6.5, 270 mOsm). Each freezing extender and thawing medium were prepared in one batch and stored frozen at -20 °C.

Freezing of spermatozoa

The semen sample was centrifuged at 300 x *g* for 6 min and the supernatant was discarded. The sperm pellet was extended with 250 µL of Extender 1. The extended sample was cooled in a bench cooler from a room temperature to reach 4 °C in about 45 min. The cooled sample was then diluted 1:1 with Extender 2. A 0.25 mL mini-straw was half filled with the extended semen. Before loading the extended semen, 10 µL of a 1:1 mixture of Extenders 1 and 2 was drawn into the straw to fill the cotton plug in the top of the straw according to Axnér et al (2004). Each sample was divided and fill into four straws. The straws were frozen as described by Rota et al. (1997). Briefly the straws were put into goblets and frozen by lowering the goblets into an Apollo SX-18 LN_2 tank (MVE Cryogenetics, New Prague, MN, USA) 16-18 cm filled with liquid nitrogen in three steps, at 7, 13 and 20 cm from the top of the tank, for 2, 2 and 1 min, respectively.

Thawing of spermatozoa

Four straws from each ejaculate were thawed in a water bath 1) at 37°C for 15 s and emptied into a prewarmed tube containing 250 µL of thawing medium 2) at 37°C for 15 s and emptied into a prewarmed tube 3) at 70°C 6 s and emptied into a prewarmed tube 4) without dilution at 70°C 6 s and emptied into a prewarmed tube containing 250 µL of thawing medium. Thereafter they were held in the dark at 38 °C. After 5 min at 38 °C (time 0) and 2, 4 and 6 h after thawing, aliquots were removed for evaluation of sperm motility, progressive motility, membrane integrity and acrosome status.

Statistical analyses

Means are expressed as means ± SEM. Data on post-thaw motility, plasma membrane integrity and acrosome integrity were analyzed using ANOVA (PROC GLM; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). A pair-wise t-test was applied to compare differences between the means of sperm

characteristics after thawing at different temperatures and with or without dilution. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Volume of ejaculates from all males averaged 64.5 ± 34.9 μL with sperm motility of 85.5 ± 6.8%, progressive motility of 4.7 ± 0.4, percentage of intact membrane of 88 ± 7.2 and percentage of intact acrosome of 74 ± 11.2. Total number of spermatozoa per ejaculate averaged 30.6 ± 23.6 x 10^6. The mean percentage of morphologically normal sperm head was 72.9 ± 8.7 and the mean percentage of morphologically normal midpiece and tail was 75.5 ± 7.5. Mean percentage of various morphological abnormalities of head, midpiece and tail was demonstrated in Table 1. Sperm characteristics were different between cats, between ejaculates and between times of incubation after thawing ($P < 0.05$). Freezing and thawing resulted in a significant reduction of spermatozoa with motility, progressive motility, intact membranes and intact acrosomes ($P < 0.05$) (Table 2, 3, 4, and 5). Thawing at 70°C 6 s and diluted with Tris buffered resulted in the best motility compared to the others ($P < 0.05$).The post-thaw dilution significantly improved the sperm motility, progressive motility and percentages of intact acrosomes ($P < 0.05$). However, there was no difference of the membrane integrity at 0 h after thawing ($P > 0.05$).

Table 1 Means (± SEM) percentages of abnormal and normal cat spermatozoa in the ejaculate

Head abnormalities	
Proximal droplet	3.8±1.9
Distal droplet	1.7±1.4
Simple bent tail	12.2±6.9
Coil tail	4.4±3.7
Abnormal midpieces	1.0±0.5
Acrosome defect	2.1±1.9
Loose	3.3±1.9
Normal head	72.9±8.7
Midpiece and tail abnormalities	
Narrow	5.3±3.2
Narrow at the base	3.6±2.1
Pear-shape	1.5±0.9
Giant, broad,round	4.5±3.6
Abnormal contour	3.5±1.9
Abaxial	2.6±1.7
Loose	5.0±4.1
Normal midpiece and tail	75.5±7.5

N = Six cats with six ejaculates each.

Table 2 Means (± SEM) percentages of motility of cat spermatozoa at 0, 2, 4, and 6 h after thawing

Thawing method	0 h	2 h	4 h	6 h
At 37°C	59.7±9.7[a]	52.5±9.7[a]	38.1±10.9[a]	25.3±10.0[a]
At 37°C, diluted in Tris buffered	64.2±10.4[b]	61.7±9.3[b]	47.2±11.1[b]	33.1±13.7[b]
At 70°C	59.2±11.1[a]	53.3±9.9[a]	43.8±11.2[b]	26.7±10.7[a]
At 70°C, diluted in Tris buffered	65.4±11.2[c]	61.7±9.6[b]	51.1±12.6[b]	33.6±11.5[b]

Means within columns with different letters differ significantly ($P < 0.05$).

Table 3 Means (± SEM) progressive motility of cat spermatozoa at 0, 2, 4, and 6 h after thawing

Thawing method	0 h	2 h	4 h	6 h
At 37°C	3.6±0.6[a]	3.3±0.5[a]	2.5±0.7[a]	2.1±0.7[a]
At 37°C, diluted in Tris buffered	3.9±0.5[b]	3.7±0.5[b]	3.1±0.6[b]	2.4±0.9[b]
At 70°C	3.6±0.6[a]	3.4±0.5[a]	2.7±0.5[a]	2.0±0.5[a]
At 70°C, diluted in Tris buffered	4.1±0.4[b]	3.8±0.5[b]	3.3±0.6[b]	2.6±0.7[c]

Means within columns with different letters differ significantly ($P < 0.05$).

Table 4 Means (± SEM) percentages of intact membranes of cat spermatozoa at 0, 2, 4, and 6 h after thawing

Thawing method	0 h	2 h	4 h	6 h
At 37°C	61.0±12.5[a]	57.4±13.4[a]	48.3±10.7[a]	46.5±10.6[a,b]
At 37°C, diluted in Tris buffered	63.8±8.8[a]	62.9±9.1[b]	55.6±10.5[b]	51.5±10.2[a]
At 70°C	64.5±14.0[a]	60.2±12.5[a,b]	51.7±11.1[a,b]	44.8±13.8[b]
At 70°C, diluted in Tris buffered	65.1±14.7[a]	61.0±14.3[a,b]	55.7±14.3[b]	50.6±14.3[a]

Means within columns with different letters differ significantly ($P < 0.05$).

Table 5 Means (± SEM) percentages of cat spermatozoa with intact acrosomes at 0, 2, 4, and 6 h after thawing

Thawing method	0 h	2 h	4 h	6 h
At 37°C	39.7±19.0[a]	32.0±17.7[a]	28.2±17.4[a]	18.7±12.9[a]
At 37°C, diluted in Tris buffered	47.0±20.3[b]	39.7±18.6[b]	34.2±14.8[a]	23.7±13.2[a]
At 70°C	39.6±22.1[a]	31.3±19.3[a]	28.0±17.8[a]	17.8±13.0[a]
At 70°C, diluted in Tris buffered	47.7±20.2[a,b]	34.6±16.2[a,b]	32.3±16.0[a]	24.0±13.4[a]

Means within columns with different letters differ significantly ($P < 0.05$).

Discussion

With the cryoprotocol used in this study, frozen ejaculated cat spermatozoa can be thawed either at 37 or 70 °C, resulting in similar post-thaw sperm characteristics. However, thawing at 70°C for 6 s and diluted with Tris buffered resulted in the best motility at 0 h compared to the others. This is in agreement with the study in dogs, demonstrating that thawing at 70 °C is preferable for sperm longevity during incubation at 38 °C regardless of slow or fast freezing rates (Peña and Linde-Forsberg, 2000). Different rates of warming have been shown to influence post-thaw motility and acrosome integrity of dog spermatozoa (Olar et al., 1989, England, 1992). At rewarming, if not fast enough, the small ice crystals formed in the cell can recrystallize, building up larger crystals that will mechanically damage the cell. A too fast thawing when the freezing rate has been very slow, in contrast, might create a sudden osmotic stress to the dehydrated cell, resulting in swelling of the spermatozoa (Mazur 1984).

The thermoresistance test has been shown to be an accurate clinical test for predicting fresh human sperm fertilizing potential and the fertilization rate in *in vitro* fertilization (Alvarez et al., 1996). In boars, the thermoresistance test gives a better indication of fertility than does estimation of immediate post-thaw motility (Larsson and Einarsson, 1976). The results from this study indicated that neither thawing temperature nor dilution did influence the thermoresistance of cat ejaculated spermatozoa, indicated by the similar decreased values of sperm characteristics between different temperatures at thawing in a time-dependent manner.

Addition of Equex STM paste to the freezing extender has been postulated as causing reduction of sperm longevity during post-thaw *in vitro* incubation of cat epididymal spermatozoa (Axnér et al., 2004). Using the same cryoprotocol, lower reductions of all sperm characteristics during post-thaw *in vitro* incubation were demonstrated in this study compared to the previous report (Axnér et al., 2004), indicating that the ejaculated cat spermatozoa were more resistant to *in vitro* incubation in the medium containing Equex. Ejaculated and epididymal spermatozoa have different membrane characteristics. Ejaculated and epididymal spermatozoa have for example different susceptibility for cold shock (White, 1993). Since cat spermatozoa are easily damaged by the freeze-thaw process (Pope et al., 1991; Wood et al., 1993; Lengwinat and Blottener, 1994), the cryopretective effect of Equex on the sperm quality may be valuable for post-thaw ejaculated spermatozoa.

Significant volume change occurs at thawing when the cell exchanges intracellular cryoprotectant for re-entry of water (Gao et al., 1995). The better post-thaw results in the diluted samples in this study likely indicated that post-thaw dilution reduces osmotic stress caused by rewarmed cryoprotectants. However, it seems that membrane integrity was less sensitive to changes in osmolality than motility and acrosome integrity because similar percentages of membrane integrity were observed in post-thaw samples with and without a dilution. This is in agreement with the previous report in cat spermatozoa exposed to anisotonic conditions and return to isotonicity (Pukazhenthi et al., 2002).

In conclusions, 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 favorable to sperm motility and acrosome integrity.

Acknowledgement

This work was financial supported by the Thailand Research Fund (TRF) (contact number MRG4780201). The authors thank Assist.Prof.Dr.Padet Tummaruk for assistance on statistical analyses.

References

Alvarez, J.G., Minaretzis, D., Barret, C.B., Mortola, J.F. and Thompson, I.E. 1996. The sperm stress test: a novel test that predicts pregnancy in assisted reproductive technologies. Fertil. Steril. 65, 400-405.

Axnér, E., Hermansson, U. and Linde Forsberg, C. 2004. The effect of Equex STM paste and sperm morphology on post-thaw survival of cat epididymal spermatozoa. Anim. Reprod. Sci. 84, 179-191.

Chatdarong, K., Ponglowhapan, S., Manee-In, S and Pongphet, K. 2006. The use of propofol for electroejaculation in domestic cats. Theriogenology

Cheng, F.P., Fazeli, A., Voorhout, W.F., Marks, A., Bevers, M.M. and Colenbrander, B. 1996. Use of peanut agglutinin to assess the acrosomal status and the zona pelllucida-induced acrosome reaction in stallion spermatozoa. J. Androl 17, 674-682.

CITES, 2000. Convention on international trade of endangered species of wild flora and fauna. CITES-listed species database. Fauna. Châtelaine-Genève, Switzerland: CITES.

England, G.C.W. 1992. The cryopreservation of canine semen. Thesis, University of London.

Gao, D.Y., Mazur, P. and Critser, J.K. 1997. Fundamental cryobiology of mammalian spermatozoa. In: A.M. Karow, J.K. Critser (Eds.), Reproductive Tissue Banking, Academic Press, San Diego, pp. 263-328.

Gao, D.Y., Liu, J., Liu, C., McGann, L.E., Watson, P.F., Kleinhans, F.W., Mazur, P., Critser, E.S. and Critser, J.K. 1995. Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. Hum. Reprod. 10, 1109-1122.

Larsson, K. and Einarsson, S. 1976. Enfluence of boars in the relationship between fertility and post thawing sperm quality of deep frozen boar spermatozoa. Acta Vet. Scand. 17, 74-82.

Lengwinat, T. and Blottner, S. 1994. In vitro fertilization of follicular oocytes of domestic cat using fresh and cryopreserved epididymal spermatozoa. Anim. Reprod. Sci. 35, 291-301.

Mazur, P. 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. Am. J. Physiol. 247, 125-142.

Nakagata, N. and Takeshima, T. 1992. High fertilizing ability of mouse spermatozoa diluted slowly after cryopreservation. Theriogenology 37, 1283-1291.

Olar, T.T., Bowen, R.A. and Pickett, B.W. 1989. Influence of extender, cryopreservative and seminal processing procedures on post thaw motility on canine spermatozoa frozen in straws. Theriogenology 31, 451-461.

Peña, A. and Linde-Forsberg, C. 2000. Effects of Equex, one- or two-step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. Theriogenology 54, 859-875.

Pope, C.E., Turner, J.L., Quatman, S.P. and Dresser, B.L. 1991. Semen storage in the domestic felid: a comparison of cryopreservation methods and storage temperatures. Biol. Reprod. 44, 257.

Platz, C.C., Wildt, D.E. and Seager, S.W.J. 1978. Pregnancy in the domestic cat after artificial insemination with previously frozen spermatozoa. J. Reprod. Fertil. 52, 279-282.

Pukazhenthi, B., Spindler, R., Wildt, D., Bush L.M. and Howard, J. 2002. Osmotic properties of spermatozoa from felids producing different proportions of pleiomorphisms: influence of adding and removing cryoprotectant. Cryobiology 44, 288-300.

Rota, A., Ström, B., Linde-Forsberg, C. And Rodriguez-Martinez, H. 1997. Effects of STM paste on viability of frozen thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38 °C. Theriogenology 47, 1093-1101.

Sekoni, V.O., Gustafsson, B.K. and Mather, E.C. 1981. Influence of wet fixation, staining techniques, and storage time on bull sperm morphology. Nord. Vet. Med. 33, 161-166.

Watson, P.F. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. Reprod. Fertil. Dev. 7, 871-891.

White, I.G. 1993. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. Reprod. Fertil. Dev. 5, 639-658.

Wildt, D.E., Schiewe, M.C., Schmidt, P.M., Goodrowe, K.L., Howard, J.G., Phillips, L.G., O'Brien, S.J. and Bush, M. 1986. Developing animal model systems for embryo technologies in rare and endangered wildlife. Theriogenology 25, 33-51.

Wood, T.C., Swanson, W.F., Davis, R.M., Anderson, J.E. and Wildt, D.E. 1993. Functionality of sperm from normo versus teratospermic domestic cats cryopreserved in pellets or straw containers. Theriogenology 39, 342.

Zambelli, D., Caneppele, B., Castagnetti, C. and Belluzzi, S. 2002. Cryopreservation of cat semen in straws: comparison of five different freezing rates. Reprod. Domest. Anim. 37, 1-4.

Output ที่ได้จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุน

1. **ผลงานวิจัยส่งตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ 3 เรื่อง**
   1.1. Chatdarong, K., Manee-In, S., Thuwanut, P., Axnér, E and Lohachit, C. Effect of post-thaw dilution and thawing temperature on viability of cat spermatozoa. (in preparation).
   1.2. Chatdarong, K., Axnér, E., Lohachit, C. and Linde Forsberg, C. The optimal time and site for artificial insemination in the domestic cat. (in preparation).
   1.3. Thongphagdee, A., Numchaisrikha, P., Rungsiwiwut, R., Omsongkram, S., Chatdarong, K., Kamolnorranath, S. and Techakumphu, M. 2006. In vitro development of marbled cat embryos derived from interspecies somatic cell nuclear transfer. *Reprod. Dom. Anim.* 41, 219-226.
2. **ผลงานวิจัยนำเสนอในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ 4 เรื่อง**
   2.1. Axnér, E., Chatdarong, K., Lohachit, C. and Linde Forsberg, C. 2005. Effect of post-thaw dilution and thawing temperature on viability of cat spermatozoa. *Reprod. Dom. Anim.* 40, 359 (Abstract).
   2.2. Thongphagdee, A., Numchaisrika, P., Chatdarong, K., Wongtawan, T., Rungarunlert, S., Rattanakorn, P., Kamolnorranath, S., Dumnui, S. and Techakumphu, M. 2005. Cloned flat-headed cat (*Prionailurus planiceps*) embryos produced from interspecies somatic cell nuclear transfer. *Proceedings of the 1th Scientific Meeting of the Asian Zoo & Wildlife Medicine*, October 28-30th, Bangkok, 37-38 (Abstract).
   2.3. Chatdarong, K., Axnér, E., Lohachit, C. and Linde Forsberg, C. 2006. The optimal time and site for artificial insemination in the domestic cat. *Proceedings of the 5th biannual congress of European Veterinary Society for Small Animal Reproduction,* April 7-9th, Budapest, 310 (Abstract).
   2.4. Tharasanit, T., Manee-In S., Rungarunlert S., Sananmuang T., Chatdarong K., Techakamphu M. and Lohachit C. 2006. Effects of recombinant human follicle stimulating hormone on developmental competence of cat oocytes. *Proceedings of the 3rd annual conference of Asian Reproductive Biotechnology Society*, Nov.29th-Dec.3rd, Hanoi (Abstract)

3. **การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์**

เชิงอนุรักษ์ สามารถนำไปใช้ในสัตว์ป่าตระกูลแมวที่หายากหรือใกล้สูญพันธุ์ โดยจัดตั้งศูนย์เก็บน้ำเชื้อแช่แข็งแมวป่าชนิดต่าง ๆ ที่มีอยู่ในสวนสัตว์ เพื่อนำไปใช้ในการผสมเทียม หรือเทคโนโลยีชีวภาพทางการสืบพันธุ์ขั้นสูงต่อไป เช่น การโคลนนิ่ง การปฏิสนธิในหลอดทดลอง เป็นต้น

เชิงวิชาการ งานวิจัยนี้ก่อให้เกิดการวิจัยต่อเนื่อง โดยนำตัวอสุจิแช่แข็งไปใช้ประโยชน์ในงานวิจัยที่ใช้เทคโนโลยีชีวภาพขั้นสูง และยังเป็นประโยชน์ทางการเรียนการสอนสำหรับนิสิตสัตวแพทย์