



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การเก็บและรักษาน้ำเชื้อสุจิจากอวัยวะไคมิสและหลอด
น้ำจากต่อมลูกหมากต่อคุณภาพของอสุจิจากอวัยวะไคมิสในสุนัข

โดย ผศ.น.สพ.ดร. สุธสรร ศิริไวยพงษ์ และคณะ

มิถุนายน 2546

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การเก็บและรักษาน้ำเชื้อสุมิจากอพิติไคมิสและผลของ
น้ำจากต่อมลูกหมากต่อคุณภาพของอสุจิจากอพิติไคมิสในสุนัข

คณะผู้วิจัย

สังกัด

1. ผศ.น.สพ.ดร.สุทธพร ศิริไวยพวงศ์

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. รศ.น.สพ.ดร.ชัยณรงค์ โลหิต

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

การเก็บและรักษาน้ำเชื้ออสุจิจากอภิติไคมิส และผลของน้ำจากต่อมลูกหมาก ต่อคุณภาพของอสุจิจากอภิติไคมิสในสุนัข

สุดสรร ศิริไวยพวงศ์ และ ชัยณรงค์ โลหิต

ภาควิชาสัตวศาสตร์ เชนเวชวิทยา และวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ถ.อังรีนงค์ กรุงเทพฯ ๑๐๓๓๐

บทคัดย่อ

ปัจจุบันมีการนำอสุจิที่ผ่านการเก็บรักษาโดยการแช่เย็น หรือแช่แข็งมาใช้ในการผสมเทียมสุนัขเป็นจำนวนมาก นอกจากอสุจิที่ได้จากการรีดเก็บแล้ว อสุจิจากท่อนิพิติไคมิสยังถูกนำมาใช้เป็นแหล่งอนุรักษ์พันธุ์กรรม อสุจิจากท่อนิพิติไคมิสที่ผ่านการแช่แข็งแล้ว จะมีการเคลื่อนที่ และการรอดชีวิตที่ต่ำลงอย่างมาก การจัดการกับอสุจีก่อนการแช่แข็ง โดยเฉพาะวิธีการเก็บอสุจิ อาจมีผลต่อคุณภาพอสุจิทั้งก่อน และภายหลังการแช่แข็ง ตามปกติแล้วน้ำจากต่อมลูกหมากจะเป็นตัวช่วยการเคลื่อนผ่านของอสุจิ แต่มีรายงานว่าอาจมีผลต่อการเคลื่อนที่ของอสุจิที่ผ่านการแช่แข็งด้วย การศึกษานี้มุ่งหมายที่จะสำรวจคุณภาพของอสุจิจากท่อนิพิติไคมิสจากวิธีการเก็บหลายๆอย่าง และผลของน้ำจากต่อมลูกหมากต่อคุณภาพอสุจิจากท่อนิพิติไคมิส อสุจิจากท่อนิพิติไคมิสถูกเก็บจากอัมชะสุนัข 30 ตัวที่ผ่านการทำหมัน โดยสุนัขทุกตัวมีประวัติความสมบูรณ์พันธุ์ปกติ แบ่งอภิติไคมิสเป็น 6 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 2 และ 3 อสุจิถูกเก็บโดยการชะล้างท่อน้ำน้ำเชื้อด้วยเข็มชะล้างโดยใช้สารละลาย พิบีเอส หรือ ทีซีเอ็ม 199 หรือน้ำยาละลายน้ำเชื้อ (ทริสและไข่แดง) ตามลำดับ กลุ่มที่ 4 5 และ 6 จะใช้วิธีคัตอภิติไคมิสเป็นชิ้นเล็กๆในภาชนะที่มีสารละลายข้างต้น ทำการตรวจอสุจิโดยดูการเคลื่อนที่ การมีชีวิต และความสมบูรณ์ของผนังหุ้มอสุจิด้วยวิธีการบวมตัวเมื่ออยู่ในสารไฮโปออสโมติก กลุ่มที่ 3 และ 6 จะถูกนำไปแช่แข็งต่อ และนำมาละลายเมื่อวันที่ 7 เพื่อตรวจคุณภาพ โดยแบ่งเป็นสองส่วน ส่วนแรกตรวจทันที ส่วนที่สองนำมาใส่น้ำจากต่อมลูกหมาก (1:1) แล้วจึงตรวจ ผลการทดลองพบว่า กลุ่ม 2 และ 3 มีการเคลื่อนที่ดีกว่า กลุ่มที่ 1 4 5 และ 6 (81 ± 8 และ 83 ± 6 ต่อ 44 ± 12 , 39 ± 8 , 72 ± 8 และ 74 ± 16 %, ตามลำดับ) แต่กลุ่มที่ 1 และ 4 เท่านั้นที่มีการรอดชีวิตต่ำกว่ากลุ่มอื่นๆ ภายหลังการแช่แข็งและละลายในกลุ่มที่ 3 และ 6 พบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ (20 ± 13 และ 20 ± 8 %) และตัวรอดชีวิต (27 ± 16 and 24 ± 12 %) ต่ำลงมาก แต่ไม่ต่างกันระหว่างกลุ่ม เมื่อเติมน้ำจากต่อมลูกหมากลงไป การเคลื่อนที่ที่จะเพิ่มขึ้นเล็กน้อย (27 ± 9 และ 23 ± 12 % ในกลุ่ม 3 และ 6 ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญ แต่จำนวนตัวอสุจิมีชีวิตไม่แตกต่าง ส่วนความสมบูรณ์ของผนังหุ้มอสุจิจะลดลงอย่างมาก สรุปได้ว่าวิธีการเก็บอสุจิจากอภิติไคมิสมีผลต่อการเคลื่อนที่ของอสุจิ การเคลื่อนที่ การรอดชีวิต และความสมบูรณ์ของผนังหุ้มอสุจิลดลงอย่างมากภายหลังการแช่แข็ง น้ำจากต่อมลูกหมากช่วยเพิ่มการเคลื่อนที่ในระยะต้น แต่มีผลเสียต่อคุณภาพอสุจิเมื่อเติมน้ำลงในระยะเวลาหนึ่ง

คำสำคัญ: สุนัข อสุจิ อภิติไคมิส การเก็บ การแช่แข็ง น้ำจากต่อมลูกหมาก

Collection and Preservation of Canine Epididymal Sperm and Effect of Prostatic Fluid on its Quality

Sudson Sirivaidyapong and Chainarong Lohachit

Department of Obstetrics Gynaecology and Reproduction, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand. E-mail sudson@chula.com

Abstract

The number of preserved sperm used in canine artificial insemination has increased dramatically. Recently, not only spermatozoa from ejaculate but also sperm cells from epididymis are important for gamete preservation. Cryopreservation of canine epididymal sperm resulted in a significant reduction of the sperm motility and viability. Prior to the freezing process, technique for sperm collection may influence quality of the sperm and then affects the frozen-thawed sperm characteristic. Moreover, prostatic fluid that naturally supports sperm transportation may affect the post-thawed sperm motility. This study aimed to investigate the quality of epididymal sperm collected by various methods before and after cryopreservation and the effect of prostatic fluid on the epididymal sperm characters. Cauda epididymides were obtained from 30 dogs of various breeds aged from 1.2-6 years following castration. The epididymides were randomly divided into 6 groups for sperm collection. In group 1, 2 or 3, fine needle was inserted through proximal vas deferens to flush 1 ml of PBS, TCM199 or Egg yolk Tris extender (EYT), respectively and let the fluid with sperm cells drop into a petri dish. Sperm from group 4, 5 or 6 was collected by repeated dicing of the epididymides in petri dishes contained 1 ml of PBS, TCM199 or EYT, respectively. Motility of sperm was subjectively assessed while sperm viability was examined using Nigrosin-Eosin stain and Hypo-osmotic swelling test was used to investigate the plasma membrane integrity. The samples from groups 3 and 6 were further diluted with EYT with 7% glycerol, then, processed for freezing and stored for 7 days. The frozen sperm samples were then thawed and divided into 2 aliquots, one aliquot was directly assessed for motility and viability while the other aliquot was added with prostatic fluid (1:1) before assessing of sperm characteristics. The sperm from groups 2 and 3 showed significantly higher motility than that from groups 1, 4, 5 and 6 (means $\pm$ SD: 81 $\pm$ 8 and 83 $\pm$ 6 versus 44 $\pm$ 12, 39 $\pm$ 8, 72 $\pm$ 8 and 74 $\pm$ 16 %, respectively). However, the sperm viability from only groups 1 and 4 were significantly lower than that from groups 2, 3, 5 and 6 (45 $\pm$ 10 and 44 $\pm$ 8 versus 84 $\pm$ 7, 81 $\pm$ 12, 82 $\pm$ 11 and 79 $\pm$ 9 %, respectively). Sperm samples from groups 3 and 6 showed significantly declined in motility (20 $\pm$ 13 and 20 $\pm$ 8%) and viability (27 $\pm$ 16 and 24 $\pm$ 12%) after freezing and thawing than those before the cryopreservation but no difference between groups. Prostatic fluid significantly enhanced sperm motility to 27 $\pm$ 9 and 23 $\pm$ 12% (group 3 and 6) but had no effect on sperm viability while plasma membrane was found significantly deteriorated. The study concludes that method of sperm collection affects epididymal sperm motility. Freezing and thawing result in lower semen quality. Prostatic fluid flavour post-thawed sperm motility in a short period but has an adversely effect on post-thawed sperm characteristics in an extended duration.

Keywords: Canine, spermatozoa, epididymis, collection, freezing, prostatic fluid

Executive Summary

สัญญาเลขที่ PDF/28/2544

โครงการ: การเก็บและรักษาน้ำเชื้อสุมจากอภิติไคมิสและผลของ

น้ำจากต่อมลูกหมากต่อคุณภาพของน้ำเชื้อสุมจากอภิติไคมิสในสุนัข

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ปัจจุบันมีการนำอสุจิที่ผ่านการเก็บรักษาโดยการแช่เย็น หรือแช่แข็งมาใช้ในการผสมเทียมสุนัขเป็นจำนวนมาก นอกจากอสุจิที่ได้จากการรีดเก็บแล้ว อสุจิจากท่ออภิติไคมิสยังถูกนำมาใช้เนื่องจากเป็นแหล่งอนุรักษ์พันธุ์กรรม อสุจิจากท่ออภิติไคมิสที่ผ่านการแช่แข็งแล้ว จะมีการเคลื่อนที่ และการรอดชีวิตที่ต่ำลงอย่างมาก การจัดการกับอสุจีก่อนการแช่แข็ง โดยเฉพาะวิธีการเก็บอสุจิ อาจมีผลต่อคุณภาพอสุจิตั้งก่อน และภายหลังการแช่แข็ง ตามปกติแล้วน้ำจากต่อมลูกหมากจะเป็นตัวช่วยการเคลื่อนผ่านของอสุจิ แต่ไม่มีรายงานการมีผลต่อการเคลื่อนที่ของอสุจิจากอภิติไคมิสที่ผ่านการแช่แข็ง จากการศึกษาเบื้องต้น พบว่าอิมตะที่คัดออกจากสุนัขภายหลังการทำหมัน สามารถนำมาทำการเก็บน้ำเชื้อสุมจากท่อส่วนอภิติไคมิสได้ การแช่แข็งเพื่อทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อสุมจากการหลัง สามารถกระทำได้และปฏิบัติเป็นประจำในปัจจุบัน แต่การเก็บรักษาน้ำเชื้อสุมจากอภิติไคมิสยังไม่มีการศึกษาเป็นที่แพร่หลาย ดังนั้นการศึกษาวิธีการเก็บและรักษาน้ำเชื้อสุมจากแหล่งนี้ จึงมีความสำคัญและจำเป็นเพื่อใช้ประโยชน์ในอนาคตสำหรับการเก็บรักษาสายพันธุ์ของสัตว์เลี้ยง หรือสัตว์ป่าหายากที่มีความจำเป็นต้องคัดอิมตะออกหรือได้ตายลง อนึ่งน้ำเชื้อจากอภิติไคมิสเป็นน้ำเชื้อที่ไม่ได้ผสมกับน้ำจากต่อมลูกหมากดังเช่นน้ำเชื้อที่ได้จากการหลังอสุจิ ดังนั้นการศึกษาลักษณะของน้ำจากต่อมลูกหมากต่อคุณภาพของน้ำเชื้อจากอภิติไคมิส จึงมีความสำคัญในการเก็บและรักษาน้ำเชื้อเหล่านี้

2. วัตถุประสงค์

- เพื่อศึกษาวิธีที่เหมาะสมในการเก็บน้ำเชื้อสุมที่ทำการเก็บจากอภิติไคมิส
- เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อสุมจากอภิติไคมิสโดยการแช่แข็ง
- เพื่อศึกษาผลของน้ำจากต่อมลูกหมากต่อน้ำเชื้อจากอภิติไคมิส ทั้งภายหลังจากการเก็บ และภายหลังจากการเก็บรักษาน้ำเชื้อเหล่านี้

3. ระเบียบการวิจัย

การเก็บอสุจิ

อสุจิจะถูกเก็บจากอภิติไคมิสของสุนัขเพศผู้อายุ 1.5-5 ปี จำนวน 30 ตัว ที่มีประวัติการเจริญพันธุ์อยู่ในเกณฑ์ปกติ ภายหลังการทำหมันโดยการคัดอิมตะ

อิมพิไลมิสจะถูกแยกออกจากส่วนของอัมชะ แบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม กลุ่ม 1 2 และ 3 ทำการฉีดสารละลาย 3 ชนิดคือ PBS, TCM199 หรือ Egg Yolk Extender ตามลำดับ เข้าไปในท่อนำน้ำเชื้อเข้าสู่อิมพิไลมิสส่วนปลายที่ตัดออกมา แล้วทำการเก็บอสุจิที่ไหลออกมาในภาชนะ กลุ่ม 4 5 และ 6 ทำการตัดอิมพิไลมิสเป็นชิ้นเล็กๆ ในภาชนะที่มีสารละลายดังกล่าวทั้ง 3 ชนิด ตามลำดับ

การเก็บน้ำต่อมลูกหมาก

โดยเก็บภายหลังการรีดน้ำเชื้อแล้วนำมาปั่นแยกตะกอน จากนั้นนำมาแช่แข็งที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เมื่อจะนำมาใช้ จะทำการอุ่นที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส

การเก็บรักษาสอสุจิโดยการแช่แข็ง

นำอสุจิที่ได้ในกลุ่มที่ 3 และ 6 มาละลายใน Egg Yolk Tris Extender เพิ่มเติม ให้มีปริมาณอสุจิประมาณ 200 ล้านตัวต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการแช่แข็งโดยวิธี CLONE (Govette *et al.*, 1996) โดยทำการปรับอุณหภูมิ (Equilibrate) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วเติม Egg Yolk Tris Extender ซึ่งมี Glycerol แล้วบรรจุในหลอดเก็บน้ำเชื้อปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร หรือ 0.5 มิลลิลิตร (ขึ้นกับปริมาตรที่ได้ภายหลังการละลาย) จากนั้นลดอุณหภูมิลงอย่างเป็นขั้นตอนทีละน้อยจนเก็บน้ำเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส

การละลายน้ำเชื้อ

เมื่อทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อที่แช่แข็งไว้เป็นระยะเวลา 7 วัน จึงทำการละลายน้ำเชื้อ นำหลอดบรรจุน้ำเชื้อที่ทำการแช่แข็งมาละลายที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

การเติมน้ำต่อมลูกหมากหรือสารเจือจางน้ำเชื้อ

อสุจิที่ละลายแล้วจะถูกแบ่งเป็น 2 ส่วนเท่า ๆ กัน ส่วนที่หนึ่ง ทำการประเมินคุณภาพทันทีภายหลังการละลาย ส่วนที่สอง ทำการเติมน้ำต่อมลูกหมากในปริมาตรน้ำเชื้อ 1 ส่วนต่อน้ำต่อมลูกหมาก 1 ส่วน แล้วประเมินคุณภาพ

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ (Semen evaluation)

การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อเบื้องต้น โดยดูอสุจิมิชีวิต (*Viability*)

ทำการตรวจดูจำนวนอสุจิที่มีชีวิตโดยการย้อมสีด้วย Eosin-Nigrosin

การตรวจการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิ (*Motility*)

ทำการตรวจดูจำนวนอสุจิที่เคลื่อนที่ไปข้างหน้า โดยนำน้ำเชื้อมาหยดบนสไลด์กระจกประมาณ 1 หยด ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ แล้วตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่างชนิดตัดแสงการประเมินการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิก็คือเป็นร้อยละโดยประมาณ

การตรวจความสมบูรณ์ของผนังหุ้มตัวอสุจิ (*Plasma membrane integrity*)

เป็นการประเมินความแข็งแรงของผนังหุ้มตัวอสุจิว่ามีความแข็งแรงมากน้อยเพียงใด ซึ่งมีผลต่ออัตราการผสมติด (Jeyendran *et al.*, 1984; England and Plummer, 1993) วิธีการประเมินจะนำน้ำเชื้ออสุจิไปหยดในสารละลายที่มีความเข้มข้นต่ำกว่า (HOST หรือ Hypoosmotic swelling test) ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์แสงสว่างชนิดตัดแสงโดยมีหลักการว่าเมื่อนำน้ำอสุจิหยดลงในสารละลายที่

มีความเข้มข้นต่ำกว่า โดยใช้สารละลายที่มีน้ำตาลฟรุกโตสที่มีความเข้มข้น 60 มิลลิออสโมล (Kumi-Diaka, 1993) ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำเชื้อปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 45 นาที แล้วจึงนำมานับตัวอสุจิที่มีการรอดตัวของหางโดยหลักการของสารละลายน้อยจะซึมผ่านผนังหุ้มตัวอสุจิแบบออสโมซิส ทำให้อสุจิบวมตัวและมีผลทำให้อสุจิมีการรอดตัว (Kumi-Diaka, 1993) ซึ่งลักษณะการรอดตัวนี้จะบ่งบอกถึงความแข็งแรงสมบูรณ์ของผนังหุ้มอสุจิว่ายังสามารถทำงานได้

การวิเคราะห์และประเมินผล

ทำการเก็บข้อมูลเพื่อนำมาทำการวิเคราะห์และประเมินผลดังนี้

การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (Motility) การมีชีวิตของอสุจิ (Viability) จำนวนตัวอสุจิที่บวมตัวจากการตรวจความแข็งแรงของผนังหุ้มตัวอสุจิด้วยวิธี HOST เปรียบเทียบกันในแต่ละกลุ่มก่อนการแช่แข็ง จากนั้นภายหลังจากแช่แข็งและละลายน้ำเชื้อ เติมน้ำจากค่อมลูกหมากแล้วนำมาเปรียบเทียบกันในแต่ละกลุ่ม

วิธีวิเคราะห์และประเมินผลจะใช้ ANOVA และ Paired T-test. ทำการเปรียบเทียบในแต่ละกลุ่ม โดยจะมีความแตกต่างเมื่อ $P < 0.05$

4. แผนการวิจัย

ในแต่ละช่วงจะดำเนินการวิจัยต่อเนื่อง ทำการเก็บข้อมูล นำมาวิเคราะห์ และเขียนรายงาน โดยใช้ระยะเวลาทั้งสิ้นรวม 24 เดือน

5. ผลงานที่คาดว่าจะตีพิมพ์ในแต่ละปี

ปีที่ 1: ชื่อผลงาน: Motility and Viability of Canine Epididymal Sperm collected by different methods

ตีพิมพ์ใน: Proceeding of The 3rd EVSSAR Congress. Liège, Belgium, May 10-12: 170

ปีที่ 2: ชื่อผลงาน: Collection and Preservation of Canine Epididymal Sperm and Effect of Prostatic Fluid on its Quality

คาดว่าจะตีพิมพ์ใน:

Theriogenology /
Animal Reproduction Science /
Journal of Veterinary Medicine /
Reproductive Domestic Animal

6. งบประมาณโครงการ

	ปีที่ 1	ปีที่ 2	รวม
1. หมวดค่าตอบแทน			
-ค่าตอบแทนหัวหน้าโครงการ	120,000	120,000	240,000
2. หมวดค่าวัสดุ	90,000	60,000	150,000
- Sperm photometer			
- Chemical agent for sperm collection			
- Chemical agent for sperm preservation			
- Micropipet			
- Plastic tube and tips			
- Others			
3. หมวดค่าใช้สอย	-	10,000	10,000
- ค่าเดินทาง และประชุมผู้วิจัย-			
รวมงบประมาณโครงการ	210,000	190,000	400,000

Collection and Preservation of Canine Epididymal Sperm and Effect of Prostatic Fluid on its Quality

Sudson Sirivaidyapong and Chainarong Lohachit

Department of Obstetrics Gynaecology and Reproduction, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand. E-mail sudson@chula.com

Abstract

The number of preserved sperm used in canine artificial insemination has increased dramatically. Recently, not only spermatozoa from ejaculate but also sperm cells from epididymis are important for gamete preservation. Cryopreservation of canine epididymal sperm resulted in a significant reduction of the sperm motility and viability. Prior to the freezing process, technique for sperm collection may influence quality of the sperm and then affects the frozen-thawed sperm characteristic. Moreover, prostatic fluid that naturally supports sperm transportation may affect the post-thawed sperm motility. This study aimed to investigate the quality of epididymal sperm collected by various methods before and after cryopreservation and the effect of prostatic fluid on the epididymal sperm characters. Cauda epididymides were obtained from 30 dogs of various breeds aged from 1.2-6 years following castration. The epididymides were randomly divided into 6 groups for sperm collection. In group 1, 2 or 3, fine needle was inserted through proximal vas deferens to flush 1 ml of PBS, TCM199 or Egg yolk Tris extender (EYT), respectively and let the fluid with sperm cells drop into a petri dish. Sperm from group 4, 5 or 6 was collected by repeated dicing of the epididymides in petri dishes contained 1 ml of PBS, TCM199 or EYT, respectively. Motility of sperm was subjectively assessed while sperm viability was examined using Nigrosin-Eosin stain and Hypo-osmotic swelling test was used to investigate the plasma membrane integrity. The samples from groups 3 and 6 were further diluted with EYT with 7% glycerol, then, processed for freezing and stored for 7 days. The frozen sperm samples were then thawed and divided into 2 aliquots, one aliquot was directly assessed for motility and viability while the other aliquot was added with prostatic fluid (1:1) before assessing of sperm characteristics. The sperm from groups 2 and 3 showed significantly higher motility than that from groups 1, 4, 5 and 6 (means $\pm$ SD: 81 $\pm$ 8 and 83 $\pm$ 6 versus 44 $\pm$ 12, 39 $\pm$ 8, 72 $\pm$ 8 and 74 $\pm$ 16 %, respectively). However, the sperm viability from only groups 1 and 4 were significantly lower than that from groups 2, 3, 5 and 6 (45 $\pm$ 10 and 44 $\pm$ 8 versus 84 $\pm$ 7, 81 $\pm$ 12, 82 $\pm$ 11 and 79 $\pm$ 9 %, respectively). Sperm samples from groups 3 and 6 showed significantly declined in motility (20 $\pm$ 13 and 20 $\pm$ 8%) and viability (27 $\pm$ 16 and 24 $\pm$ 12%) after freezing and thawing than those before the cryopreservation but no difference between groups. Prostatic fluid significantly enhanced sperm motility to 27 $\pm$ 9 and 23 $\pm$ 12% (group 3 and 6) but had no effect on sperm viability while plasma membrane was found significantly deteriorated. The study concludes that method of sperm collection affects epididymal sperm motility. Freezing and thawing result in lower semen quality. Prostatic fluid flavour post-thawed sperm motility in a short period but has an adversely effect on post-thawed sperm characteristics in an extended duration.

Keywords: Canine, spermatozoa, epididymis, collection, freezing, prostatic fluid

Introduction

At present, genetic preservation is an important issue in human and animal biotechnological science. Cryopreservation of dog semen is widely used for long-term preservation of genetic material or transporting it. Deep freezing dog sperm was successfully applied several years ago (Gill, 1970) adopting the freezing and storage technique of bovine semen. Subsequently, the freezing protocols and composition of extenders have frequently been modified and optimized (Linde-Forsberg 1995). Spermatozoa of the dog maintain their viability well during physiological storage in the cauda epididymidis. Thus, they also gain the ability of normal movement in the epididymis. Ejaculated spermatozoa are suspected to have a relatively short lifespan compared to spermatozoa in the epididymis. This is probably due to many factors include differences between epididymal and prostatic fluids (or seminal plasma in other species), environmental condition in epididymis and in prostatic fluid. Prostatic fluid is normally added to the sperm cells during ejaculation and it supports sperm transport and coats the sperm plasma membrane (Sirivaidyapong *et al.*, 1999). It has a detrimental effect when it is used to preserve spermatozoa from ejaculation at 4°C in the absence of extender (Rota *et al.*, 1995). Previous study demonstrated that a low concentration of prostatic fluid in a proficiently collected sperm-rich fraction of a dog ejaculate does not affect the sperm quality characteristics of semen diluted in egg yolk Tris extender and incubated at 4°C for 6 hours (Sirivaidyapong *et al.*, 2001). However, the need to remove excess prostatic fluid was suggested because centrifugation of semen followed by resuspension in prostatic fluid prior to freezing had an adverse effect on progressive motility and viability. The addition of prostatic fluid did not appear to alter the acrosome integrity of viable sperm in any preservation systems (Sirivaidyapong *et al.*, 2001). Moreover, correlation between post-thaw motility and acrosome integrity of cryopreserved semen could not be observed after addition of prostatic fluid (Oettlé 1993; Szász *et al.*, 2000; Sirivaidyapong *et al.*, 2001).

Most of the studies and research works concerning sperm cryopreservation have focused on sperm from ejaculate. However, there are several reasons that the ejaculates could not be collected and some animals have to undergo orchidectomy before obtaining offspring. Also in some reasons, semen cannot be collected from the dogs, and also in some cases, testicles of, either economically or mentally valuable dogs may have been necessary removed. Furthermore, some exotic species are approaching extinction and these animals could be possibly died suddenly.

The spermatozoa of such animals can be obtained from the epididymis for the genetic availability. Epididymal sperm collection and preservation is one technique that can be applied for preserving the genetic material of those animals.

Cryopreservation of canine epididymal sperm resulted in a significant reduction of the sperm motility and viability (Hewitt *et al.*, 2001). Prior to the freezing process, technique for sperm collection may influence quality of the sperm and then affects the frozen-thawed sperm characteristic (Concannon and Battista, 1989).

Prostatic fluid in dog or seminal plasma in other species supports sperm transportation in female genital tract. Epididymal sperm has yet been contacted with the prostatic fluid or seminal plasma results in the inability of such transportation. Therefore, a study on epididymal sperm handling is a significant way to enhance the sperm capacity for fertilizing an egg (Sirivaidyapong *et al.*, 2000).

In conclusion, this study aimed to investigate the quality of epididymal sperm collected by various methods and the effect of prostatic fluid on its quality.

The importance of the study may be able to provide a standard method to collect and preserve epididymal sperm, this information will be useful for genetic preservation in dog and exotic animals.

Materials and Methods

Experiment I; assessment of fresh epididymal sperm characteristics collected by different methods

I. Animals

Thirty male dogs of various breeds aged from 1.2-7 years with the normal fertile history were selected.

II. Prostatic fluid collection and preservation

Samples of prostatic fluid were collection by digital manipulation from another 12 fertile dogs by digital manipulation. All samples (pH= 6.3-6.7) were separately collected following sperm collection and then processed for centrifugation at 600 x g for 20 minutes. Subsequently, removed the supernatant, then, repeated the centrifugation and the supernatant of the samples were collected. Samples of prostatic fluid were put in small tubes (2 ml in each tube) and frozen at - 20°C. Before using of prostatic fluid, the sample was inserted into 37°C waterbath for 5 minutes.

III. Sperm collection and dilution

Cauda epididymides were obtained from those 30 dogs following castration. The epididymides were randomly divided into 6 groups for sperm collection and dilution.

In group 1, fine needle was inserted through proximal vas deferens to flush 1 ml of Phosphate Buffered Saline (PBS).

In group 2, 1 ml of TCM199 (tissue culture medium; M199 powder No.0887 Gibco BRL U.S.A., Hepes No.H3375 Sigma U.S.A., NaHCO₃, Penicillin and Streptomycin) was used to replace the PBS in group 1.

In group 3, 1 ml of Egg yolk Tris (EYT) extender (Sirivaidyapong *et al.*, 2000) was used to replace the PBS as in group 1.

In each group, let the fluid with sperm cells drop into a petri dish (Figure 1).



Figure1. Sperm is flushed through proximal vas deferens using various media

Sperm from group 4, 5, or 6 was collected by repeated dicing or mincing of the epididymides in petri dishes contained 1 ml of PBS, TCM199 or EYT, respectively.

IV. Sperm assessment

Sperm sample from each group was taken for the assessment.

Motility of sperm was subjectively assessed at 37° C under a phase-contrast microscope at sudden after collection.

Sperm viability (number of dead and lived sperm cell) was examined using Nigrosin-Eosin stain.

Sperm plasma membrane integrity was assessed using hypo-osmotic swelling (HOS) test by incubation of 0.1 ml of sperm dilution in 1.0 ml of 60 mOsmol fructose solution at 37° C for 45 minutes. Subsequently, a drop of solution was placed on a slide, covered with a coverslip and examined under a phase-contrast microscope (x 400). The percentage of swollen or curled spermatozoa was determined as sperm cells with intact plasma membrane (Jeyendran et al., 1984; Kumi-Diaka, 1993).

Experiment II; assessment of frozen-thawed epididymal sperm characteristics and the effect of prostatic fluid

The samples from groups 3 and 6 were further diluted with EYT with 7% glycerol, then, processed for freezing (Govette *et al.*, 1996) and stored for 7 days before assessing of sperm characteristics.

After thawing, each sperm sample was divided into 2 aliquots;

First aliquot was directed assessed for motility, viability and plasma membrane integrity as mentioned.

The second aliquot was added with prostatic fluid (1:1) before the assessments.

Statistic Analysis

Data are expressed as mean $\pm$ SD. Data were subjected to one way ANOVA and Paired T-test. Differences in motility, viability and % of membrane integrity were considered significant when $P < 0.05$.

Results

The epididymal sperm from groups 2 and 3 showed significantly higher motility than that from groups 1, 4, 5 and 6 (means $\pm$ SD: 81 $\pm$ 8 and 83 $\pm$ 6 versus 44 $\pm$ 12, 39 $\pm$ 8, 72 $\pm$ 8 and 74 $\pm$ 16 %, respectively). However, the sperm viability from only groups 1 and 4 were significantly lower than that from groups 2, 3, 5 and 6 (45 $\pm$ 10 and 44 $\pm$ 8 versus 84 $\pm$ 7, 81 $\pm$ 12, 82 $\pm$ 11 and 79 $\pm$ 9 %, respectively, figure 2).

Sperm samples from groups 3 and 6 showed significantly declined in motility (20 $\pm$ 13 and 20 $\pm$ 8%) and viability (27 $\pm$ 16 and 24 $\pm$ 12%) after freezing and thawing than those before the cryopreservation but no difference between groups.

Interestingly, the frozen-thawed sperm aliquot that had been added with prostatic fluid (1:1) demonstrated significantly improved sperm motility to 27 $\pm$ 9 and 23 $\pm$ 12% (groups 3 and 6). However, when the viability was assessed from those sperm groups, no difference (26 $\pm$ 8 and 24 $\pm$ 5%) could be found (Figure 3).

The freshly epididymal spermatozoa from all groups showed high percentage of plasma membrane integrity and the figures decreased dramatically in the frozen-thawed spermatozoa, especially, in the aliquot added with prostatic fluid. (Table 1)

Interestingly, an additional observation of the post-thawed epididymal sperm samples incubation with prostatic fluid for 45 minutes found a remarkable decline in sperm motility to 12 ± 3 and 7 ± 5 %.

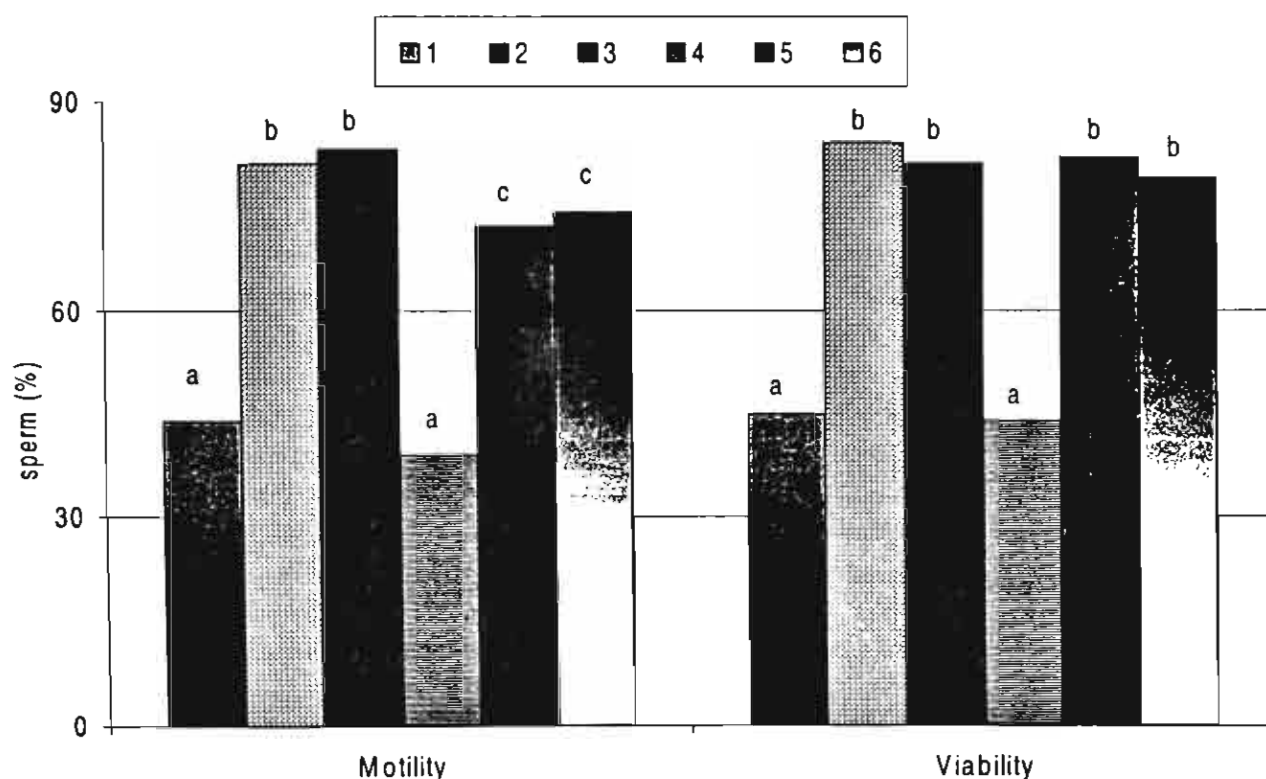


Figure 2. The motility and viability of canine epididymal spermatozoa collected using 6 different techniques are demonstrated, a, b and c indicate significant differences ($P < 0.05$). Mean of epididymal sperm from 30 fertile dogs are shown.

Table 1. Percentages of swollen spermatozoa after incubation with hypo-osmotic solution for 45 minutes are shown. Means $\pm$ SD of 30 dogs are demonstrated; a, b, c and d indicate significant differences when $P < 0.05$.

Group	Percentage of intact plasma membrane spermatozoa		
	Pre-freeze	Post-thaw	Post-thaw (with prostatic fluid)
1	56 ± 4^a	-	-
2	92 ± 3^b	-	-
3	95 ± 12^b	32 ± 5^c	12 ± 7^d
4	58 ± 8^a	-	-
5	87 ± 10^b	-	-
6	88 ± 7^b	30 ± 5^c	9 ± 5^d

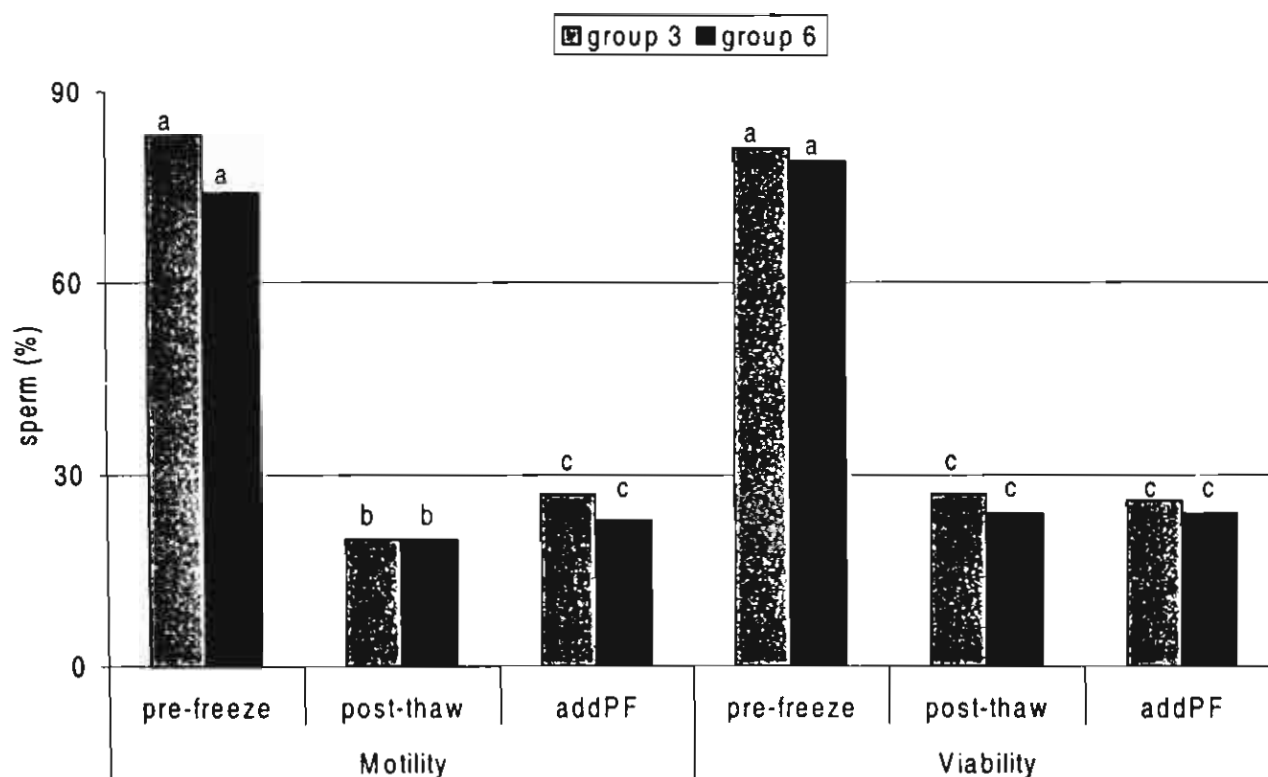


Figure 3. The percentage of motility and viability of spermatozoa from pre-freeze, frozen-thawed and frozen-thawed added with prostatic fluid are shown. Mean percentage derived from 12 dogs and differences are indicated with a, b and c ($P < 0.05$).

Discussion

The results of the study demonstrate that the motility of canine epididymal sperm affects by the sperm collection methods. Canine epididymal spermatozoa collection using technique of flushing through the proximal vas deferens (figure 1) results in higher sperm motility than that using dicing technique, although, the techniques have no effect on sperm viability. The dicing of cauda epididymis resulted in a high number of particles from the minced epididymis and may affect the motility pattern of spermatozoa.

Sperm diluent used during the cumulative process of sperm affects sperm motility. Phosphate Buffer Saline or PBS does not support sperm motility as do by TCM199 and semen extender. Phosphate Buffer Saline appeared to impair the motility and viability of epididymal sperm as shown from the results. Within a short period of time a, TCM199 and Egg Yolk Tris Extender did not show the different effects on the sperm motility and viability. Sperm diluent used during the cumulative process of sperm affects sperm motility. Because the epididymal sperm does not contact with prostatic fluid, the diluent used to extend the sperm may mainly affect the motility of either fresh or cryopreserved sperm, not by prostatic fluid (Sirivaidyapong *et al.*, 2001). However, the effect on those sperm characteristics after a prolonged period after collection needed to be investigated.

Epididymal sperm from group 3 and 6 had been diluted with egg yolk Tris extender which was a proper diluent for further freezing procedure. Although, the epididymal spermatozoa diluted in TCM199 (group 2 and 4) also illustrated high motility and viability as shown in previous report on canine ejaculates (Risopatrón *et al.*, 2002), they could not be directly process for freezing because of the improper property of TCM199 for cryopreservation. Therefore, this medium may be suitable for dilution of canine epididymal sperm and storing at short period, then processing for further biotechnological purposes.

The epididymal spermatozoa in this experiment exhibited relatively much higher total motility than that showed in previous report (Hewitt *et al.*, 2001), although that study reported a progressive motility. Dicing the epididymides resulted in a large number of fine particles and this observation found that spermatozoa always attached their head to those small particles which may be the reason of this difference in motility.

Nevertheless, the frozen-thawed sperm also demonstrated the significantly decline in either motility or viability. The motility and viability of sperm collected by fine needle flushing did not different from those collected by dicing technique after freezing and thawing may due to the extremely decrease in those characters.

Canine spermatozoa appear to exhibit much shorter post-thaw survival than spermatozoa of other species and the progressive motility generally drops below 11% within 1-4 hours of thawing (Concannon and Battista, 1989).

High figures of standard deviation revealed wide range of differences in the rate of motility and viability reduction in post-thawed spermatozoa of different samples. In this respect, the individual differences of epididymal spermatozoa among dogs in response to cooling (Yu *et al.*, 2002) could be a reason.

The investigation of freshly collected epididymal sperm plasma membrane integrity demonstrated high percentages of spermatozoa with intact plasma membrane as also shown in a previous report (Yu and Liebo, 2002) using fluorescene staining assessment.

The plasma membrane integrity of epididymal sperm decreased significantly after freezing and thawing process exhibited a higher number of membrane damage and sperm dead from the procedure as showed in spermatozoa from ejaculates. Acrosome integrity has been shown to be critical for the fertilizing ability of a spermatozoon and, in this respect, the integrity of the acrosome of canine ejaculated spermatozoon has been shown to decrease dramatically after freezing and thawing (Oettlé, 1986; Rodriguez-Martinez *et al.*, 1993). In contrast with a study reported that addition of autologous prostatic fluid to frozen-thawed dog semen improved litter size, conception rate and pregnancy rate in bitches (Nöthling and Volkmann, 1993).

When the prostatic fluid was present, post thawed epididymal sperm motility increased which was similar to other previous reports, in other species such as rabbit (Castellini *et al.*, 2000), and goat (Azerêdo *et al.*, 2001), on the effect of seminal plasma on ejaculated sperm motility.

Conversely, a long incubation period of post-thawed epididymal spermatozoa with prostatic fluid during the hypo-osmotic swelling test resulted in the tremendous decline of spermatozoa with intact plasma membrane. From this observation, motility of the sperm also greatly decreased after 45 minutes of the incubation. This may due to the direct effect of extended duration after the sperm had been thawed or the effect of prostatic fluid on post-thawed epididymal sperm plasma membrane which could not be found in the ejaculates (Sirivaidyapong *et al.*, 2001). The effect of prostatic fluid on membrane damage

seems to be doubtful since previous studies reported that some substances in seminal plasma e.g. glutathione, may play a role in protecting human spermatozoa against oxidative membrane damage (Lewis *et al.*, 1997; Rajmakers *et al.*, 2003).

However, spermatozoa and seminal plasma from different species may express diverse characters. Incubation of spermatozoa from canine ejaculates with prostatic fluid and cooled to 4° C resulted in the obviously decline of motility and detriment the sperm plasma membrane (Rota *et al.*, 1995). Study in bovine epididymal spermatozoa showed that exposure of the spermatozoa to accessory sex gland fluid accelerated the death of sperm cells (Way *et al.*, 2000). In addition, the motility and capacity to fertilize oocytes *in vitro* of mouse epididymal spermatozoa decreased with the presence of seminal plasma (Tecirlioglu *et al.*, 2002).

The current study suggested that proper diluent and technique for sperm obtaining can yield significant higher motility and viability of canine epididymal sperm. Prostatic fluid has a favorable effect on canine epididymal sperm motility in a short period of time but then has adversely effect on the sperm characteristics after an extended period. Species and individual differences are among major factors affected gamete cryobiology and have to be cautiously concerned. The development of epididymal sperm cryopreservation techniques and information of factors influenced in sperm quality could be applied to use in genetic resource preservation either in canine or other exotic species.

Acknowledgement

The authors thank The Thailand Research Fund for the financial support on this study.

References

- Azerêdo GA, Esper CR and Resende KT. 2001. Evaluation of plasma membrane integrity of frozen-thawed goat spermatozoa with or without seminal plasma. *Sm Ruminant Res.* 41: 257-263.
- Castellini C, Lattaioli P, Moroni M and Minelli A. 2000. Effect of seminal plasma on the characteristics and fertility of rabbit spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 63: 275-282.
- Concannon PW and Battista M. 1989. Canine semen freezing and artificial inseminations. In: Kirk RW (ed). *Current Veterinary Therapy 10th: Small animal practice.* Philadelphia, PA, Saunders: 1247-1259.
- Gill HP, Kaufman CF, Foot RH and Kirk RW. 1970. Artificial insemination of beagle bitches with freshly collected, liquid-stored, and frozen-stored semen. *Am J Vet Res* 31:1807-1813.
- Govette, G, Linde-Forsberg, C and Strom, B. 1996. A successful concept for freezing of dog semen. *13th Int Congr Anim Reprod (ICAR).* 2: 5-8.
- Hewitt DA, Leahy R, Sheldon IM and England GCW. 2001. Cryopreservation of epididymal dog sperm. *Anim Reprod Sci.* 67: 101-111.
- Jeyendran RS, van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG and Zeneveld LJD. 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil.* 70:219-225.
- Kumi-Diaka J. 1993 Subjecting canine semen to hypo-osmotic test. *Theriogenology.* 39: 1279-7289.

Lewis SEM, Sterling ESL, Young IS and Thompson W. 1997. Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. *Fertil Steril*. 67: 142-147.

Linde-Forsberg C. 1995. Artificial insemination with fresh, chilled extended, and frozen-thawed semen in the dog. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)* ; 10(1): 18-58.

Nöthling JO and Volkmann DH. 1993. Effect of addition of autologous prostatic fluid on the fertility of frozen thawed dog semen after intravaginal insemination.

Oettlé EE. 1986. Changes in acrosome morphology during cooling and freezing of dog semen. *Anim Reprod Sci*. 12: 145-150.

Raijmakers MTM, Steegers EAP, Steegers-Theunissen RPM, Mulder TPJ, Knapen MFCM, Wong WY and Peters WHM. 2003. Glutathione and glutathione S-transferases A1-1 and P1-1 in seminal plasma may play a role in protecting against oxidative damage to spermatozoa. *Fertil Steril*. 79:169-172.

Risopatrón J, Catalán S, Miska W, Schill WB and Sánchez R. 2002. Effect of albumin and polyvinyl alcohol on the vitality, motility and acrosomal integrity of canine spermatozoa incubated in vitro. *Reprod Domest Anim*. 37:347-51.

Rodriguez-Martinez H, Ekwall H. and Linde-Forsberg C. 1993. Fine structure and elemental composition of fresh and frozen dog spermatozoa. *J Reprod Fertil Suppl*. 47: 279-285.

Rota A, Strom B and Linde-Forsberg C. 1995. Effect of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C. *Theriogenology*. 44: 885-900.

Sirivaidyapong S, Cheng FP, Marks A, Voorhout WF, Bevers MM and Colenbrander B. 2000. Effect of sperm diluents on the acrosome reaction in canine sperm. *Theriogenology*. 53(3): 789-802.

Sirivaidyapong S, Ursem P., Bevers MM. and Colenbrander B. 2001. The effect of prostatic fluid on motility, viability and acrosome integrity of chilled and frozen-thawed dog sperm. *J Reprod Fertil (suppl)*. 57: 383-386.

Tecirlioglu RT, Lacham-Kaplan O and Trounson AO. 2002. Effects of electrical stimulation and seminal plasma on the motility of mouse sperm. *Reprod Fertile Dev*. 14: 471-478.

Way AL, Griel LC and Killian GJ. 2000. Effect of accessory sex gland fluid on viability, capacitation and the acrosome reaction of cauda epididymal bull spermatozoa. *J Andro*. 21: 213-219.

Yu I, Songsasen N, Godke RA and Leibo SP. 2002. Differences among dogs in response of their spermatozoa to cryopreservation using various cooling and warming rates. *Cryobiol*. 44: 62-78.

Yu I and Leibo SP. 2002. Recovery of motile, membrane-intact spermatozoa from canine epididymides stored for 8 days at 4°C. *Theriogenology*. 57: 1179-1190.

การเก็บและรักษาน้ำเชื้ออสุจิจากอภิติไคมิส และผลของน้ำจากต่อมลูกหมาก ต่อคุณภาพของอสุจิจากอภิติไคมิสในสุนัข

สุทธรร ศิริไวยพวงศ์ และ ชัยณรงค์ โลหิต

ภาควิชาสัตวศาสตร์ เภสัชวิทยา และวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ถ.อรัญญิก กรุงเทพฯ ๑๐๓๓๐

บทคัดย่อ

ปัจจุบันมีการนำอสุจิที่ผ่านการเก็บรักษาโดยการแช่เย็น หรือแช่แข็งมาใช้ในการผสมเทียมสุนัขเป็นจำนวนมาก นอกจากอสุจิที่ได้จากการรีดเก็บแล้ว อสุจิจากท่อนอภิติไคมิสยังถูกนำมาใช้เป็นแหล่งอนุรักษพันธุ์กรรม อสุจิจากท่อนอภิติไคมิสที่ผ่านการแช่แข็งแล้ว จะมีการเคลื่อนที่ และการรอดชีวิตที่ต่ำลงอย่างมาก การจัดการกับอสุจีก่อนการแช่แข็ง โดยเฉพาะวิธีการเก็บอสุจิ อาจมีผลต่อคุณภาพอสุจิตั้งก่อน และภายหลังการแช่แข็ง ตามปกติแล้วน้ำจากต่อมลูกหมากจะเป็นตัวช่วยการเคลื่อนผ่านของอสุจิ แต่มีรายงานว่าอาจมีผลต่อการเคลื่อนที่ของอสุจิที่ผ่านการแช่แข็งด้วย การศึกษานี้มุ่งหมายที่จะสำรวจคุณภาพของอสุจิจากท่อนอภิติไคมิสจากวิธีการเก็บหลายๆอย่าง และผลของน้ำจากต่อมลูกหมากต่อคุณภาพอสุจิจากท่อนอภิติไคมิส อสุจิจากท่อนอภิติไคมิสถูกเก็บจากอัมชะสุนัข 30 ตัวที่ผ่านการทำหมัน โดยสุนัขทุกตัวมีประวัติความสมบูรณ์พันธุ์ปกติ แบ่งอภิติไคมิสเป็น 6 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 2 และ 3 อสุจิถูกเก็บโดยการชะล้างท่อนำน้ำเชื้อด้วยเข็มชะล้างโดยใช้สารละลาย ฟิบีเอส หรือ ทีซีเอ็ม199 หรือน้ำยาละลายน้ำเชื้อ (ทริสและไข่แดง) ตามลำดับ กลุ่มที่ 4 5 และ 6 จะใช้วิธีตัดอภิติไคมิสเป็นชิ้นเล็กๆในภาชนะที่มีสารละลายข้างต้น ทำการตรวจอสุจิโดยการเคลื่อนที่ การมีชีวิต และความสมบูรณ์ของผนังหุ้มอสุจิด้วยวิธีดูการบวมตัวเมื่ออยู่ในสารไฮโปออสโมติก กลุ่มที่ 3 และ 6 จะถูกนำไปแช่แข็งต่อ และนำมาละลายเมื่อวันที่ 7 เพื่อตรวจคุณภาพ โดยแบ่งเป็นสองส่วน ส่วนแรกตรวจทันที ส่วนที่สองนำมาใส่น้ำจากต่อมลูกหมาก (1:1) แล้วจึงตรวจ ผลการทดลองพบว่า กลุ่ม 2 และ 3 มีการเคลื่อนที่ที่ดีกว่า กลุ่มที่ 1 4 5 และ 6 (81 ± 8 และ 83 ± 6 ต่อ 44 ± 12 , 39 ± 8 , 72 ± 8 และ 74 ± 16 %, ตามลำดับ) แต่กลุ่มที่ 1 และ 4 เท่านั้นที่มีการรอดชีวิตต่ำกว่ากลุ่มอื่นๆ ภายหลังการแช่แข็งและละลายในกลุ่มที่ 3 และ 6 พบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ (20 ± 13 และ 20 ± 8 %) และตัวรอดชีวิต (27 ± 16 and 24 ± 12 %) ต่ำลงมาก แต่ไม่ต่างกันระหว่างกลุ่ม เมื่อเติมน้ำจากต่อมลูกหมากลงไป การเคลื่อนที่ที่จะเพิ่มขึ้นเล็กน้อย (27 ± 9 และ 23 ± 12 % ในกลุ่ม 3 และ 6 ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญ แต่จำนวนตัวอสุจิมียชีวิตไม่แตกต่าง ส่วนความสมบูรณ์ของผนังหุ้มอสุจิจะลดลงอย่างมาก สรุปได้ว่าวิธีการเก็บอสุจิจากอภิติไคมิสมีผลต่อการเคลื่อนที่ของอสุจิ การเคลื่อนที่ การรอดชีวิต และความสมบูรณ์ของผนังหุ้มอสุจิลดลงอย่างมากภายหลังการแช่แข็ง น้ำจากต่อมลูกหมากช่วยเพิ่มการเคลื่อนที่ในระยะต้น แต่มีผลเสียต่อคุณภาพอสุจิเมื่อเติมน้ำไปในช่วงเวลาหนึ่ง

คำสำคัญ: สุนัข อสุจิ อภิติไคมิส การเก็บ การแช่แข็ง น้ำจากต่อมลูกหมาก

ประโยชน์ที่ได้จากการวิจัย (Out Put)

1. เป็นข้อมูลพื้นฐานในการเก็บอสุจิจากอภิติไคมิส โดยวิธีการชะล้างด้วยการใช้เข็มสอดผ่านท่อนำน้ำเชื้อ ซึ่งทำให้ได้อสุจิที่มีการเคลื่อนที่ไปยังหน้าก่อนข้างสูง
2. ได้รับความสนใจจากนักวิจัยต่างชาติในการนำเสนอผลงาน เนื่องจากเป็นวิธีการเก็บอสุจิจากอภิติไคมิสที่ต่างออกไปจากวิธีดั้งเดิม (การตัดส่วนของอภิติไคมิสออกเป็นชิ้นเล็กๆ)
3. ผลของการแช่แข็งอสุจินั้น แตกต่างออกไปจากอสุจิจากอภิติไคมิสในสัตว์บางชนิด และใกล้เคียงกับสัตว์บางชนิด และมีผลสอดคล้อง และต่างจากรายงานอื่นในสุนัข เนื่องจากวิธีการเก็บที่แตกต่าง รวมทั้งวิธีการแช่แข็ง ซึ่งสามารถนำวิธีการเหล่านี้ไปประยุกต์ใช้ได้
4. นำจากต่อมลูกหมากซึ่งมีผลดีต่อการขนส่งอสุจิ ในสัตว์ทุกชนิด และ มีผลดีในการช่วยให้อสุจิมีการเคลื่อนที่ที่ดี มีชีวิตที่ยืนยาว และรักษาความสมบูรณ์ของผนังหุ้มอสุจินั้น จากการศึกษานี้จึงพบว่าให้ผลที่มีความแตกต่างเมื่อนำมาใช้กับอสุจิจากอภิติไคมิสในสุนัข ซึ่งเป็นทั้งผลที่ขัดแย้ง และสอดคล้องกับรายงานอื่นๆในต่างประเทศ
5. เทคนิคต่างๆ ในการวิจัย สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในสัตว์ชนิดอื่น โดยเฉพาะสัตว์ป่าหายากที่อาจตายลงอย่างไม่คาดคิด การนำอสุจิในอภิติไคมิสมาทำการเก็บรักษา จึงเป็นการอนุรักษ์พันธุ์กรรมของสัตว์เหล่านั้นได้

ภาคผนวก

ประกอบด้วย:

ผลงานตีพิมพ์ใน

Proceeding สำหรับการเสนอผลงานประชุมนานาชาติ
ณ ประเทศเบลเยียม

ระหว่างวันที่

The 3rd EVSSAR Congress. Liege, Belgium,

10-12 พฤษภาคม 2545.

หัวข้อเรื่อง

Motility and Viability of Canine Epididymal Sperm
Collected by Different Methods



UNIVERSITÉ DE LIÈGE FACULTÉ DE MÉDECINE VÉTÉRINAIRE
In association with
EUROPEAN VETERINARY SOCIETY FOR SMALL ANIMAL REPRODUCTION

THIRD EVSSAR EUROPEAN CONGRESS
ON REPRODUCTION IN
COMPANION, EXOTIC AND LABORATORY ANIMALS

EDITORS: J. VERSTEGEN, K. ONCLIN & C. LINDE-FORSBERG



Liège May 2002

MOTILITY AND VIABILITY OF CANINE EPIDIDYMAL SPERM COLLECTED BY DIFFERENT METHODS

S.Sirivaidyapong

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

Tel.662-2189752, fax.662-2520738, E-mail sudson@chula.com

Introduction

Cryopreservation of canine epididymal sperm resulted in a significant reduction of the sperm motility and viability (1). Prior to the freezing process, technique for sperm collection may influence quality of the sperm and then affects the frozen-thawed sperm characteristic (2). This study aimed to investigate the quality of epididymal sperm collected by various methods.

Materials and Methods

Cauda epididymides were obtained from 18 dogs of various breeds aged from 1-2-6 years following castration. The epididymides were randomly divided into 6 groups for sperm collection. In group 1, 2 or 3, fine needle was inserted through proximal vas deferens to flush 1 ml of PBS, TCM199* or Egg yolk Tris extender (EYT), respectively and let the fluid with sperm cells drop into a petri dish. Sperm from group 4, 5 or 6 was collected by repeated dicing of the epididymides in petri dishes contained 1 ml of PBS, TCM199 or EYT, respectively. Motility of sperm was subjectively assessed at 37°C. Sperm viability was examined using Nigrosin-Eosin stain. The samples from groups 3 and 6 were further diluted with EYT with 7% glycerol, then, processed for freezing and stored for 7 days before assessing of sperm characteristics.

Results

The sperm from groups 2 and 3 showed significantly higher motility than that from groups 1, 4, 5 and 6 (means $\pm$ SD: 81 $\pm$ 8 and 83 $\pm$ 6 versus 44 $\pm$ 12, 39 $\pm$ 8, 72 $\pm$ 8 and 74 $\pm$ 16 %, respectively). However, the sperm viability from only groups 1 and 4 were significantly lower than that from groups 2, 3, 5 and 6 (45 $\pm$ 10 and 44 $\pm$ 8 versus 84 $\pm$ 7, 81 $\pm$ 12, 82 $\pm$ 11 and 79 $\pm$ 9 %, respectively). Sperm samples from groups 3 and 6 showed significantly declined in motility (20 $\pm$ 13 and 20 $\pm$ 8%) and viability (27 $\pm$ 16 and 24 $\pm$ 12%) after freezing and thawing than those before the cryopreservation but no difference between groups.

Summary and discussion

Flushing through the proximal vas deferens for canine epididymal sperm collection results in higher sperm motility than that using dicing technique, although, the techniques have no effect on sperm viability. Sperm diluent used during the cumulative process of sperm affects sperm motility. It can be suggested that proper diluent and technique for sperm obtaining can yield significant higher motility and viability of canine epididymal sperm.

References

1. Hewitt DA, Leahy R, Sheldon IM and England GCW. 2001. Cryopreservation of epididymal dog sperm. *Anim Reprod Sci* 67: 101-111.
2. Concannon PW & Battista M. 1989. In: *Current Veterinary Therapy X*, p. 1247-1259.

* M199 powder No.0887 Gibco BRL U.S.A.+ Hepes No.H3375 Sigma U.S.A.+ NaHCO₃ + Penicillin + Streptomycin