



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.สุดสรร 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.อังรีนงด์ 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 ฟิบีเอส 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 แต่ไม่ต่างกันในระหว่างกลุ่ม 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: การเก็บและรักษาน้ำเชื้อสุจิจากอภิติไคมิสและผลของ

น้ำจากต่อมลูกหมากต่อคุณภาพของน้ำเชื้อจากอภิติไคมิสในสุนัข

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ปัจจุบันมีการนำสุจิที่ผ่านการเก็บรักษาโดยการแช่เย็น หรือแช่แข็งมาใช้ในการผสมเทียมสุนัขเป็นจำนวนมาก นอกจากสุจิที่ได้จากการรีดเก็บแล้ว อสุจิจากท่ออภิติไคมิสยังถูกนำมาใช้เนื่องจากเป็นแหล่งอนุรักษ์พันธุ์กรรม อสุจิจากท่ออภิติไคมิสที่ผ่านการแช่แข็งแล้ว จะมีการเคลื่อนที่ และการรอดชีวิตที่ต่ำลงอย่างมาก การจัดการกับอสุจีก่อนการแช่แข็ง โดยเฉพาะวิธีการเก็บอสุจิ อาจมีผลต่อคุณภาพอสุจิตั้งก่อน และภายหลังการแช่แข็ง ตามปกติแล้วน้ำจากต่อมลูกหมากจะเป็นตัวช่วยการเคลื่อนผ่านของอสุจิ แต่ไม่มีรายงานการมีผลต่อการเคลื่อนที่ของอสุจิจากอภิติไคมิสที่ผ่านการแช่แข็ง จากการศึกษาเบื้องต้น พบว่าอิมตะที่คัดออกจากสุนัขภายหลังการทำหมัน สามารถนำมาทำการเก็บน้ำเชื้ออสุจิจากท่อส่วนอภิติไคมิสได้ การแช่แข็งเพื่อทำการเก็บรักษาน้ำเชื้ออสุจิจากการหลัง สามารถกระทำได้และปฏิบัติเป็นประจำในปัจจุบัน แต่การเก็บรักษาน้ำเชื้ออสุจิจากอภิติไคมิสยังไม่มีการศึกษาเป็นที่แพร่หลาย ดังนั้นการศึกษาวิธีการเก็บและรักษาน้ำเชื้ออสุจิจากแหล่งนี้ จึงมีความสำคัญและจำเป็นเพื่อใช้ประโยชน์ในอนาคตสำหรับการเก็บรักษาสายพันธุ์ของสัตว์เลี้ยง หรือสัตว์ป่าหายากที่มีความจำเป็นต้องคัดอิมตะออกหรือได้ตายลง อนึ่งน้ำเชื้อจากอภิติไคมิสเป็นน้ำเชื้อที่ไม่ได้ผสมกับน้ำจากต่อมลูกหมากดังเช่นน้ำเชื้อที่ได้จากการหลังอสุจิ ดังนั้นการศึกษาลักษณะของน้ำจากต่อมลูกหมากต่อคุณภาพของน้ำเชื้อจากอภิติไคมิส จึงมีความสำคัญในการเก็บและรักษาน้ำเชื้อเหล่านี้

2. วัตถุประสงค์

- เพื่อศึกษาวิธีที่เหมาะสมในการเก็บน้ำเชื้ออสุจิที่ทำการเก็บจากอภิติไคมิส
- เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้ออสุจิจากอภิติไคมิสโดยการแช่แข็ง
- 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).