ผลของวิธีการแช่แข็งและชนิดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็งต่อคุณภาพน้ำเชื้อพ่อม้า ภายหลังการแช่แข็งและการทำละลาย

นาย ธนากร พจน์ประสาท

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาการสืบพันธุ์สัตว์ ภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2552
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

THE EFFECTS OF DIFFERENT FREEZING TECHNIQUES AND MONOSACCHARIDE SUGARS IN FREEZING EXTENDER ON POST-THAWED QUALITY OF STALLION SEMEN

Mr. Thanakorn Pojprasath

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Theriogenology
Department of Obstetrics, Gynaecology and Reproduction
Faculty of Veterinary Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2009

Copyright of Chulalongkorn University

522120

Thesis Title	THE EFFECTS OF DIFFERENT FREEZING TECHNIQUES AND MONOSACCHARIDE SUGARS IN FREEZING EXTENDER ON POST-THAWED QUALITY OF STALLION SEMEN
By	Mr. Thanakorn Pojprasath
Field of Study	Theriogenology
Thesis Advisor	Theerawat Tharasanit, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Associate Professor Chainarong Lohachit, Dr. Med. Vet

---

Accepted by the Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

..... Dean of the Faculty of Veterinary Science

(Professor Mongkol Techakumphu, Doctorat 3e cycle.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman

(Associate Professor Wichai Tantasuparuk, Ph.D.)

..... Thesis Advisor

(Theerawat Tharasanit, Ph.D.)

..... Thesis Co-advisor

(Associate Professor Chainarong Lohachit, Dr. Med. Vet.)

..... Examiner

(Professor Mongkol Techakumphu, Doctorat 3e cycle.)

..... External Examiner

(Assistant Professor Kulnasan Saikhun, Ph.D.)

ธนากร พจน์ประสาท : ผลของวิธีการแช่แข็งและชนิดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็งต่อคุณภาพน้ำเชื้อพ่อม้า ภายหลังการแช่แข็งและการทำละลาย (THE EFFECTS OF DIFFERENT FREEZING TECHNIQUES AND MONOSACCHARIDE SUGARS IN FREEZING EXTENDER ON POST-THAWED QUALITY OF STALLION SEMEN) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อ.น.สพ.ดร. ธีรวัฒน์ ธาราศานิต, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ.น.สพ.ดร. ชัยณรงค์ โลหชิต, 50 หน้า

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบคุณภาพอสุจิพ่อม้าภายหลังการแช่แข็งด้วยการแช่แข็งในกล่องโฟม (conventional freezing technique) หรือ เครื่องแช่แข็งควบคุมอุณหภูมิ (controlled rate freezer) และศึกษาถึงผลของชนิดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็งต่อคุณภาพอสุจิภายหลังการแช่แข็งและการทำละลาย

การทดลองที่ 1 ทำการรีดเก็บน้ำเชื้อจำนวน 3 ครั้งต่อตัวจากพ่อม้าทั้งหมด 3 ตัว น้ำเชื้อที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีอัตราการเคลื่อนที่ อสุจิมีชีวิตและรูปร่างอสุจิที่ปกติก่อนการแช่แข็งมากกว่าร้อยละ 70 การแช่แข็งน้ำเชื้อทั้งแบบกล่องโฟมและเครื่องแช่แข็งควบคุมอุณหภูมิมีผลให้ค่าเฉลี่ยของร้อยละการเคลื่อนที่และอัตราอสุจิมีชีวิตในนาทีที่10 ภายหลังการทำละลายลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับก่อนการแช่แข็ง (51.7±9.9% และ 61.3±7.4% เทียบกับ 67.8±4.4% และ 74.0±4.8% ตามลำดับ) อัตราอสุจิมีชีวิตของพ่อม้าตัวที่ 1 และ 2 ที่ทำการแช่แข็งด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิมีค่าสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการแช่แข็งในกล่องโฟม (39.6±1.1% กับ 49.4±4.2% ในชั่วโมงที่ 2 และ 32.0±1.9% กับ 40.4±2.8% ในชั่วโมงที่ 4) แต่อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างดังกล่าวในพ่อม้าตัวที่ 3

การทดลองที่ 2 ทำการรีดเก็บน้ำเชื้อจำนวน 4 ครั้งต่อตัวจากพ่อม้าทั้งหมด 6 ตัว ทำการแช่แข็งน้ำเชื้อด้วยสารละลายเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็งที่ประกอบด้วยน้ำตาลแต่ละชนิด (กลูโคส, ฟรุกโตส และ ซอร์บิทอล) จากการทดลองพบว่าน้ำตาลแต่ละชนิดมีอิทธิพลต่อการเคลื่อนที่และการมีชีวิตของอสุจิภายหลังการแช่แข็งและการทำละลายอย่างมีนัยสำคัญ สารละลายเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็งที่ประกอบด้วยน้ำตาลซอร์บิทอลให้ร้อยละการเคลื่อนที่ (50.2±7.5) และร้อยละการมีชีวิต (54.3±6.1) ของอสุจิภายหลังการทำละลายสูงกว่าน้ำตาลกลูโคส (40.6±8.5 และ 48.6±5.3) และน้ำตาลฟรุกโตส (40.0±8.8 และ 46.9±5.0) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) สารละลายเจือจางที่ประกอบด้วยน้ำตาลซอร์บิทอลและน้ำตาลกลูโคสให้ผลความสมบูรณ์ของอะโครโซมและเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิสูงกว่าน้ำตาลฟรุกโตสอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เมื่อนำน้ำเชื้อแช่แข็งที่มีส่วนประกอบของน้ำตาลซอร์บิทอลไปใช้ผสมเทียมให้กับแม่ม้าจำนวน 4 ตัว ผลการตรวจการตั้งท้องพบว่า แม่ม้าจำนวน 2 ตัวตั้งท้องโดยคิดอัตราการตั้งท้องเป็นร้อยละ 50

การศึกษาครั้งนี้สรุปว่าวิธีการแช่แข็งและชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็งมีอิทธิพลต่อการป้องกันความเสียหายที่เกิดขึ้นกับอสุจิพ่อม้าระหว่างกระบวนการแช่แข็งและการทำละลาย สารละลายเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็งที่มีประกอบของน้ำตาลซอร์บิทอล ช่วยปรับปรุงคุณภาพของน้ำเชื้อม้าแช่แข็ง

ภาควิชา สูติศาสตร์ เธนุเวชและวิทยาการสืบพันธุ์..... ลายมือชื่อนิสิต ธนากร พจน์ประสาท

สาขาวิชา วิทยาการสืบพันธุ์สัตว์..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ปีการศึกษา 2552..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

#5075568031 : MAJOR THERIOGENOLOGY

KEYWORDS : SEMEN / STALLION / FREEZING TECHNIQUE / MONOSACCHARIDE SUGARS

THANAKORN POJPRASATH: THE EFFECTS OF DIFFERENT FREEZING TECHNIQUES AND MONOSACCHARIDE SUGARS IN FREEZING EXTENDER ON POST-THAWED QUALITY OF STALLION SEMEN. THESIS ADVISOR: THEERAWAT THARASANIT, Ph.D., THESIS COADVISOR: ASSOC. PROF. CHAINARONG LOHACHIT, Dr. med. vet., 50 pp.

The objectives of this study were to compare the quality of stallion spermatozoa frozen with either conventional or controlled-rate freezing technique (EXP 1), and the effects of monosaccharide sugars on post-thawed semen quality (EXP 2).

EXP. 1. Semen from 3 stallions (3 ejaculates per stallion; >70% motility, viability and normal morphology) were used in this study. Cryopreservation reduced significantly the motility and plasma membrane integrity of stallion sperm (51.7±9.9% and 61.3±7.4%) compared unfavorably to post-equilibrated/non-frozen sperm (67.8±4.4% and 74.0±4.8%). However, sperm viability of stallion no.1 and no.2 frozen with controlled rate freezer was significantly greater than conventional method ($p<0.05$) when examined at 2 h (39.6±1.1% vs. 49.4±4.2%) and 4 h (32.0±1.9% vs. 40.4±2.8%) post-thawing. In contrast, there was no difference in sperm viability of stallion No.3 between the two freezing techniques.

EXP. 2. Semen from six fertility proven stallions (four ejaculates per stallion) was cryopreserved. After freezing and thawing, the quality of the cryopreserved semen was reduced significantly, in terms of the physical and functional characteristics of stallion sperm. All sugars (glucose, fructose and sorbitol) had a strong influence on motility and viability of stallion semen post-thawing. Sorbitol-based extender significantly yielded in higher percentages of motile (50.2%) and viable sperm (54.3%) than glucose extender (40.6% and 48.6%) or fructose extender (40.0% and 46.9%). Using sorbitol and glucose in freezing extender also resulted in higher percentage of acrosome and plasma membrane integrity of sperm than fructose ($P<0.05$). Cryopreserved stallion spermatozoa using sorbitol-based extender were inseminated into estrus mare (n=4), two (50%) mares were pregnant.

These results demonstrated convincingly that freezing techniques and sugar types in the freezing extenders play a central role in protecting sperm against cryoinjury that occurs during freezing and thawing. Sorbitol-based semen extender improves cryopreservability of stallion spermatozoa.

Department : Obstetrics, Gynaecology and Reproduction Student's Signature : Thanakorn P.

Field of Study : Theriogenology..... Advisor's Signature : Theerawat

Academic Year : 2009..... Co-advisor's Signature : .....

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was carried out at the Department of Obstetrics, Gynaecology and Reproduction, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand. The study was financially supported by THE 90th ANNIVERSARY OF CHULALONGKORN UNIVERSITY FUND (Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund).

First and foremost I would like to express my sincere gratitude to the following persons:

Prof. Dr. Annop Kunavongkrit, the Dean of the Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University and ***Assoc. Prof. Dr. Wichai Tantasuparuk,*** the head of Department of Obstetrics, Gynaecology and Reproduction, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University for their welcome and giving me access to this faculty to study for a Master of Science degree.

Dr. Theerawat Tharasanit, my main advisor, for giving me a great opportunity to study on equine reproduction and also your confident in me. I also thank you for a lot of things that you have been doing for me.

Assoc. Prof. Dr. Chainarong Lohachit, my co-advisor, for teaching me with patiently on how to become a good scientist. Thank you for all helping hands you gave during I stay here.

Thesis committee, Prof. Dr. Mongkol Techakumphu and Assist. Prof. Dr. Kulnasan Saikhun for their valuable suggestions.

Dr. Nutthee Am-In, for patience and kind advise in statistical analysis.

Ms. Junpen Suwimonteerabutr, for your kind assistance on technical support and teaching me on semen evaluation techniques and also helpful discussion.

Former and present staff members at the Department of OGR, all my friends for all helping hand, great memories and warm friendships you give.

All of member staffs at the Animals and Agricultural Department, Royal Thai Army, Karnjanaburi, for their help with horse restraining during this study.

Mr. Thananyoo Srimuang, TNC Ranch, Singburi, for their kind helping hand on sample collection.

My beloved family, grandfather, grandmother, my mom and my dad and brother, for your endless love and encouragement you give. I also would like to express my sincere thanks *to* ***Mr. Kittinan Wattananan*** whom financially supported me during my MSc program.

CONTENTS

	Page
ABSTRACT (in Thai)	iv
ABSTRACT (in English)	v
ACKNOWLEDGEMENTS	vi
CONTENTS	vii
LIST OF TABLES	viii
LIST OF FIGURES	ix
LIST OF ABBREVIATIONS	x
CHAPTER I INTRODUCTION	1
CHAPTER II LITERATURE REVIEW	4
Principle of semen cryopreservation	8
Factors affecting the cryopreservability of stallion semen	9
Stress occurred during cryopreservation	12
Polyol pathway in mammalian epididymis	13
Importance of glucose, fructose and sorbitol in stallion semen	14
Objective and expected output	17
CHAPTER III MATERIALS AND METHODS	18
Experimental design	18
Animals	20
Semen collection	20
Freezing extender	20
Semen cryopreservation and thawing	21
Assessment of sperm quality	22
Statistical analysis	25
CHAPTER IV RESULTS	26
CHAPTER V DISCUSSION	34
REFERENCES	40
CURRICULUM VITAE	50

LIST OF TABLES

Table		Page
Table 1	Composition of stallion semen.....	6
Table 2	Processing for cryopreservation stallion semen.....	7
Table 3	Compositions of freezing extenders used in this experiment.....	19
Table 4	Descriptive data of semen characteristics of fresh semen (mean ± SD).....	26
Table 5	Descriptive data of semen characteristics of fresh semen (mean ± SD).....	27
Table 6	Mean ± standard deviation of sperm motility (%) of cryopreserved semen in each stallion.....	28
Table 7	Mean ± standard deviation of sperm viability (%) of cryopreserved semen in each stallion.....	28
Table 8	Least Square Means of post-thawed stallion semen quality in freezing extenders (Ext.) containing fructose (F) or glucose (G) or sorbitol (S) at various times.....	31

LIST OF FIGURES

Figure		Page
Fig. 1	A cross-section view through a seminiferous tubule within the stallion's testis, illustrating the gradual division of spermatogonia to spermatozoa.....	4
Fig. 2	Structural details of stallion spermatozoon.....	5
Fig. 3	Diagram representing the interaction among physical changes in equine spermatozoa and sperm viability during freezing.....	9
Fig. 4	Polyol pathways.....	14
Fig. 5	Structure and molecular weight of each monosaccharide sugar ...	15
Fig.6	Photomicrographs of stallion spermatozoa stained with Calcein-AM combined with Ethidium homodimer-1.....	32
Fig. 7	A photomicrograph of stallion spermatozoa stained with FITC-PNA/Ethidium homodimer-1.....	33
Fig. 8	A photomicrograph of stallion spermatozoa incubated with a hypo-osmotic solution (100 mOsm/kg).....	33

LIST OF ABBREVIATIONS

AI	artificial insemination
AR	aldose reductase
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ET	embryo transfer
EthD-1	ethidium homodimer-1
EY	egg yolk
FITC-PNA	fluorescien isothiocyanate-labeled peanut agglutinin
FT	frozen-thawed
g	gram
hrs	hours
LN_2	liquid nitrogen
kg.	kilogram
M	molar
min	minute
mL	millititer
mM	millimolar
NAD+	nicotinamide adenine dinucleotide
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
PBS	phosphate buffered saline
SD	standard deviation
sHost	short hypo-osmotic swelling test
SORD	sorbitol dehydrogenase
SV	sperm viability
TM	total motility