



EVALUATION OF ACROSOME REACTION IN BOVINE SPERM

BY

A TRIPLE-STAINING TECHNIQUE

THAIITZ DOBA

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
(ANATOMY)

แก่นันทนาการ

จาก

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES

MAHIDOL UNIVERSITY

1991

Copyright by Mahidol University

ชื่อวิทยานิพนธ์	การวิเคราะห์ประสิทธิภาพอะโครโซมของ เซลล์อสุจิโดยวิธีการย้อมสีสามชนิด
ผู้วิจัย	ทอสิ โอบะ
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (กายวิภาคศาสตร์)
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์	กนก ภาวสุทธิไพศิฐ M.D., Ph.D. ชัยทิพย์ วณิชานนท์ Ph.D. วิทยา ธรรมวิทย์ DVM., Ms.
วันที่สำเร็จการศึกษา	21 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2534

บทคัดย่อ

เพื่อการวิเคราะห์ประสิทธิภาพและประโยชน์ของการย้อมสีแบบ 3 ชนิด ในการบ่งบอกปฏิริยาอะโครโซม เซลล์อสุจิซึ่งผ่านบวนาการว่ายน้ำขึ้นในน้ำยาเพาะเลี้ยงได้ถูกชักนำให้เกิดปฏิริยาอะโครโซมในสารเฮพาริน 10 มก/มล และ/หรือ ไลโซซอสฟาคิลลาคอลิน (แอลซี) หรือเซลล์หุ้มเซลล์ไข่ที่มีเซลล์ไข่หรือไม่มีเซลล์ไข่อยู่ด้วย ได้วิเคราะห์ปฏิริยาอะโครโซมและการอยู่รอดของเซลล์อสุจิด้วยวิธีการย้อมสีแบบ 3 ชนิด หนึ่งได้ใช้วิธีการทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องทะลุ เพื่อยืนยันผลของปฏิริยาอะโครโซมในการทดลองนี้ด้วย

เซลล์อสุจิที่ผ่านสารเฮพารินอย่างเคียว เฮพาริน+แอลซี 100 มก/มล หรือแอลซี 100 มก/มล อย่างเคียว เบอร์เซนซ์ของเซลล์อสุจิที่มีชีวิตอยู่และเกิดปฏิริยาอะโครโซมเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ถ้าหากเซลล์อสุจิผ่านแอลซีขนาด 100, 200 หรือ 400 ไมโครกรัม/มล เซลล์อสุจิที่ตายและเกิดปฏิริยาอะโครโซมเพิ่มขึ้น แต่หากเซลล์อสุจิเพาะเลี้ยงกับเซลล์หุ้มเซลล์ไข่ ไข่จะมีเซลล์ไข่ร่วมอยู่ด้วยหรือไม่ก็ตาม พบว่าปฏิริยาอะโครโซมที่เกิดขึ้นในเซลล์อสุจิที่มีชีวิตเพิ่มขึ้น แต่ไม่เปลี่ยนแปลงปฏิริยาอะโครโซมในเซลล์อสุจิที่ตายแล้ว

ผลการทดลองนี้แสดงว่า 1) สารเฮพารินสามารถทำให้เกิดปฏิริยาอะโครโซมในเซลล์อสุจิที่ผ่านบวนาการว่ายน้ำขึ้น และปฏิริยาอะโครโซมเพิ่มขึ้นตามขนาดของแอลซีที่ใส่ แม้ว่าสารแอลซีสามารถทำให้เกิดปฏิริยาอะโครโซม แต่ก็ทำให้เซลล์อสุจิตาย 2) เซลล์หุ้มเซลล์ไข่สามารถทำให้เกิดปฏิริยาอะโครโซม และทำให้เซลล์อสุจิมีชีวิตคงเดิมได้ 3) การย้อมสีแบบ 3 ชนิด ซึ่งง่าย รวดเร็วและประหยัดกว่าวิธีทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนสามารถให้การวิเคราะห์ปฏิริยาอะโครโซมได้อย่างมีประสิทธิภาพ

Thesis Title Evaluation of Acrosome Reaction in Bovine Sperm by a Triple-Staining Technique

Name Thaitz Ooba

Degree Master of Science (Anatomy)

Thesis Supervisory Committee

Kanok Pavasuthipaisit, M.D.,Ph.D

Chaitip Wanichanon, Ph.D.

Witaya Thamavit, D.V.M., M.S.

Date of Graduation 21 February B.E. 2534 (1991)

ABSTRACT

In order to investigate the efficiency and usefulness of a simple triple-staining technique (TST) in detecting the acrosome reaction (AR) of bovine sperm, motile ejaculated bovine sperm obtained by swim-up procedure were exposed to 10 µg/ml heparin and/or 100, 200 and 400 µg/ml lysophosphatidylcholine (LC), or cumulus cell masses with or without bovine oocytes. The viability and AR of the sperm were assessed by TST and AR was confirmed by TEM. After exposure of sperm to heparin, heparin + 100 µg/ml LC, or 100 µg/ml LC, percentage of live/acrosome-reacted sperm increased significantly ($P < 0.01$, $P < 0.001$, or $P < 0.001$, respectively); exposure of sperm to 100 µg/ml LC or 200 µg/ml LC or 400 µg/ml LC with or without heparin preincubation, on the other hand, increased the percentage of dead/acrosome-reacted sperm significantly ($P < 0.001$) whereas live/acrosome-reacted sperm decreased significantly ($P < 0.05$ for 200 µg/ml LC, or $P < 0.01$ for 400 µg/ml). Incubation with cumulus cell masses with or without oocytes induced AR in live sperm significantly ($P < 0.001$), but showed no significant changes of AR in dead sperm. These results indicate that 1) heparin could induce AR in swim-up separated bovine sperm and the extent of the AR was increased followed by LC treatment. However the high dose of LC has detrimental effect which would cause the sperm death; 2) cumulus-oocyte complexes also caused AR in bovine sperm as well as maintained their viability; and 3) TST could be used to evaluate the AR as efficient as TEM, but it would be more simple, more rapid and more economic.