16 SEP 1999

THE EFFECT OF CRYOPRESERVATION ON STRUCTURE AND VIABILITY OF SPERMATOZOA OF RANA TIGERINA

PIYADA CHITTANON

With compliments
of
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยดา .....

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILMENT

OF THE REQUIREMENT FOR

THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (ANATOMY)

FACULTY OF GRADUATE STUDIES

MAHIDOL UNIVERSITY

1999

ISBN 974-662-081-9

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

TH
P694d
1999
042784 e.2

3936467 SCAN/M : MAJOR : ANATOMY ; M.Sc. (ANATOMY)
KEY WORDS : SPERMATOZOA / CRYOPRESERVATION / GLYCEROL DIMETHYL SULFOXIDE / RANA TIGERINA

PIYADA CHITTANON : THE EFFECT OF CRYOPRESERVATION ON STRUCTURE AND VIABILITY OF SPERMATOZOA OF RANA TIGERINA. THESIS ADVISORS : JITTIPAN CHAVADEJ, Ph.D., PRAPEE SRETARUGSA, Ph.D., CHAITIP WANICHANON Ph.D., MALEEYA KRUATRACHUE, Ph.D. UDOMSRI SHOWPITTAPORNCHAI, Ph.D. 70 p. ISBN 974-662-081-9

This study was undertaken to investigate the motility, viability, fertilizing capacity, and the ultrastructural alteration in *Rana tigerina* spermatozoa brought about by cryopreservation. The spermatozoa were determined by assessment of the percentage of motility, motility score, and the percentage of viability after incubation with an extender containing dimethyl sulfoxide (DMSO) and glycerol. Subsequently, they were frozen to –196 °C in the presence of DMSO for 1 week. The temperature had no effect on the percentage of motile spermatozoa, motility score and sperm viability in spermatozoa stored at 4 °C for 0.5, 1, 2, and 3 h. However, the percentages of motile spermatozoa were significantly reduced after incubation in the media containing 4, 5, 6, 8, and 9% DMSO for 3 h. In contrast, the spermatozoa could not survive after incubation in media containing various concentrations of glycerol (4-9%). After 1 week of cryopreservation, the spermatozoa showed a significant decline in the percentages of motility, motility score, live spermatozoa, and fertilization capacity, when compared to the fresh semen. The spermatozoa frozen in media containing 4, 5, 6, 8, and 9 % DMSO did not move as well as those frozen in the medium containing 7 % DMSO. The incubation time in DMSO was found to be an important factor for cryopreservation. The spermatozoa incubated in the media containing 7-8 % DMSO for 1 h before freezing showed a significant difference in the number of motile spermatozoa compared with the other incubation intervals. The extender containing 7 % DMSO offered the best protection of spermatozoa viability. However, a decline in the percentage of live spermatozoa of ~ 50 % was observed. After thawing, a significant difference in fertilization rates was observed between fresh and frozen-thawed spermatozoa (98.80 ± 0.25 and 24.66 ± 5.33, respectively). The ultrastructure of frozen-thawed spermatozoa was observed under scanning and transmission electron microscopes. It was found that the plasma membrane was altered about 50% by freezing and thawing when compared with that of the fresh samples. Under SEM observation, there were fenestrations of sperm plasma membrane at the head region. The middle piece also showed considerable damage to the plasma membrane. Under TEM observation, there were some disruptions of the acrosomal membrane, and relativeiy low electron density of its interior. The plasma membrane of the middle piece appeared to be damaged. Some mitochondria were swollen and their cristaes were reduced. These ultrastructural changes and the changes in motility characteristics were thought to be the important, interrelated factors in fertilization capacity after cryopreservation.

3936467 SCAN/M : สาขาวิชา : กายวิภาคศาสตร์ ; วท.ม. (กายวิภาคศาสตร์)

ปิยดา ชิตทนนท์ : การศึกษาผลกระทบของการเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยวิธีแช่แข็งต่อการรอดชีวิตและโครงสร้างของสเปิร์มกบนา The effect of cryopreservation on structure and viability of spermatozoa of Rana tigerina. คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : จิตติพันธุ์ ชวเดช Ph.D., ประพีร์ เศรษฐรักษ์, Ph.D., ชัยทิพย์ วนิชานนท์, Ph.D., มาลียา เครือตราชู, Ph.D., อุดมศรี โชว์พิทธพรชัย, Ph.D. 70 หน้า ISBN 974-662-081-9

การศึกษาผลกระทบของการแช่แข็งน้ำเชื้อของกบนา *Rana tigerina* ต่อคุณสมบัติต่างๆ ของสเปิร์ม ได้แก่ เปอร์เซ็นต์ living sperm, เปอร์เซ็นต์ motile sperm, motility score, และ เปอร์เซ็นต์ fertilization จากการศึกษาปรากฏว่า ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของเปอร์เซ็นต์ living sperm แต่มีการลดลงของเปอร์เซ็นต์ motile sperm เพียงเล็กน้อย หลังจากเก็บน้ำเชื้อสดไว้ที่อุณหภูมิ 4 ^{o}ซ นาน 0.5, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง การเจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำยาที่มีส่วนผสมของ dimethyl sulfoxide (DMSO) และ glycerol ที่ความเข้มข้น 4-9% พบว่ามีผลต่อการดำรงชีวิตของสเปิร์ม โดยเฉพาะเปอร์เซ็นต์ motile sperm และเมื่อปล่อยทิ้งไว้ในน้ำยาดังกล่าวนาน 3 ชั่วโมงพบว่ามีการลดลงของ เปอร์เซ็นต์ motile sperm อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สเปิร์มของกบนาสามารถมีชีวิตอยู่ได้ภายหลังการเจือจางน้ำเชื้อในน้ำยาที่มีส่วนผสมของ DMSO ในทุกความเข้มข้น (4-9%)

หลังจากการแช่แข็งน้ำเชื้อใน liquid nitrogen นาน 1 สัปดาห์ ปรากฏว่ามีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของเปอร์เซ็นต์ living sperm และเปอร์เซ็นต์ motile sperm ในน้ำเชื้อที่ถูกเจือจางด้วยน้ำยาที่มีส่วนผสมของ 4-9% DMSO พบว่า เปอร์เซ็นต์ motile sperm และเปอร์เซ็นต์ living sperm มีค่าสูงสุด (33% และ 51 %, ตามลำดับ) ในน้ำเชื้อที่ถูกเจือจางด้วยน้ำยาที่มีส่วนผสมของ 7% DMSO และทิ้งไว้นาน 1 ชั่วโมงก่อนการแช่แข็ง พบว่า motility score ของสเปิร์มลดลงมามีค่าเท่ากับ 3 หลังจากการแช่แข็ง เปรียบเทียบกับในน้ำเชื้อสดซึ่งมีค่าของ motility score เท่ากับ 5 นอกจากนี้การแช่แข็งยังส่งผลกระทบต่อ เปอร์เซ็นต์ fertilization อีกด้วย พบว่าหลังจากการแช่แข็ง เปอร์เซ็นต์ fertilization มีค่าเท่ากับ 25% เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสดซึ่งมีค่าเท่ากับ 99%

การศึกษาการแช่แข็งต่อโครงสร้างละเอียดของสเปิร์มด้วยกรรมวิธีทางจุลทรรศ์อิเลกตรอนแบบส่องกราดและแบบส่องผ่าน ปรากฏว่าประมาณ 50% ของสเปิร์มมีโครงสร้างที่เปลี่ยนแปลงภายหลังจากการแช่แข็ง เยื่อหุ้มเซลล์ของสเปิร์มเป็นส่วนที่ถูกทำลายมากที่สุด พบ ความไม่ต่อเนื่องของ เยื่อหุ้มเซลล์ของส่วนหัวของสเปิร์ม โดยเฉพาะที่บริเวณอะโครโซม ในส่วนกลางของสเปิร์ม พบว่ามีการขาดหายไปของเยื่อหุ้มเซลล์ บางส่วนของไมโตคอนเดรีย ในส่วนกลาง มีการบวม และมีการลดจำนวนของคริสตี นอกจากนี้พบว่า เยื่อหุ้มเซลล์ของส่วนหางได้รับความเสียหายเล็กน้อย

Copyright © by Mahidol University