

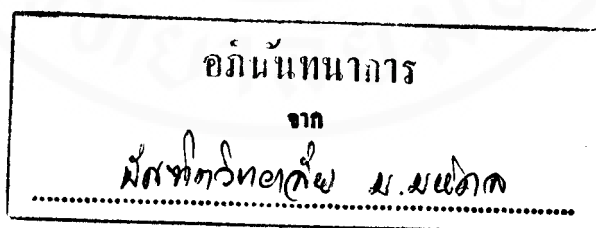
15 JUL 2000



**SEMEN ANALYSIS AND ACROSOME REACTION IN  
CATTLE AND SWAMP BUFFALOES :  
COMPARISON BETWEEN  
SWIM-UP AND PERCOLL GRADIENT CENTRIFUGATION**

**JITHATHAI JONGJIT**

๒



**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILMENT  
OF THE REQUIREMENT FOR  
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (ANATOMY)  
FACULTY OF GRADUATE STUDIES  
MAHIDOL UNIVERSITY**

2000

ISBN 974-663-578-6

**COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

TH  
๗๖๑๖  
๒๐๐๐

44862 e.2

4036334 SCAN / M : MAJOR : ANATOMY ; M.Sc. (ANATOMY)

KEY WORDS : CATTLE / SWAMP BUFFALO / SPERMATOZOA / SPERM  
PREPARATION / SEMEN ANALYSIS / ACROSOME  
REACTION

JITHATHAI JONGJIT : SEMEN ANALYSIS AND ACROSOME  
REACTION IN CATTLE AND SWAMP BUFFALOES : COMPARISON  
BETWEEN SWIM-UP AND PERCOLL GRADIENT CENTRIFUGATION.  
THESIS ADVISORS : KANOK PAVASUTHIPASIT, MD.,Ph.D., REON  
SOMANA, MD.,Ph.D., YINDEE KITIYANANT, D.V.M.,M.Sc., PRAPEE  
SRETARUGSA, Ph.D., SANGCHAI PREUTTHIPAN, M.D. 78 p. ISBN 974-663-  
578-6

Swim-up and Percoll gradient centrifugation are two most commonly used methods for sperm recovery in assisted reproductive laboratories. The superiority of sperm obtained from the two methods are inconclusive. Therefore, the objective of this study was to compare the effectiveness of these two methods of sperm preparation from cattle and swamp buffalo semen. The assayed parameters were concentration, motility, normal morphology and acrosome reaction. Semen samples were obtained from a single cattle and a single swamp buffalo. The samples were divided into two equal parts. The first part was prepared by a swim-up method whereas the other was prepared by a Percoll gradient centrifugation. In both species, the swim up method was significantly superior than Percoll gradient centrifugation superior in the percentage of motility (cattle: 94.96 vs 76.88 ; swamp buffaloes 95.75 vs 75.02) and normal morphology (cattle: 72 vs 70.60 ; swamp buffalo 77.49 vs 74.91). Whereas, the latter procedure yielded higher sperm concentration in cattle (3.67 vs 6.03) but not in swamp buffaloes (7.14 vs 6.98). However there was no significant difference in the means of grading motility between the two procedures in both species (cattle 3.9 vs 3.87 ; swamp buffalo 3.84 vs 3.8). Acrosomal status was investigated after being treated with heparin and stained by FITC-PNA. A significant correlation between the percentage of acrosome reaction and duration of incubation was found. The magnitude of the increment of acrosome reaction was significantly higher in cattle than that in swamp buffaloes from both preparation methods.

The present studies indicated that both cattle and swamp buffalo spermatozoa separated by swim up and Percoll gradient centrifugation procedures increase in the percentage of motility, normal morphology and grading motility comparing to initial semen samples. The percentage of motility and normal morphology except sperm concentration were better in the swim up method than those in Percoll gradient centrifugation. Moreover, heparin incubation caused a significant increase of sperm acrosome reaction in which the magnitude was higher in cattle than swamp buffaloes. Acrosome reaction in both species was clearly demonstrated by the FITC-PNA method.

4036334 SCAN / M : สาขาวิชา : ภายวิภาคศาสตร์ : วท.ม. (ภายวิภาคศาสตร์)

จิตหทัย จงจิตร : การวิเคราะห์น้ำเชื้อ และปฏิกิริยาอะโครโซมในโคและ  
 กระบือ : เปรียบเทียบระหว่างวิธีการปั่นแยกด้วยชั้นของน้ำยาเปอร์คอลล (SEMEN ANALYSIS  
 AND ACROSOME REACTION IN CATTLE AND SWAMP BUFFALOES : COMPARISON  
 BETWEEN SWIM-UP AND PERCOLL GRADIENT CENTRIFUGATION). คณะกรรมการ  
 ควบคุมวิทยานิพนธ์ : กนก ภาวสุทธิไพศิฐ, MD.,Ph.D., เรือน สมณะ, MD.,Ph.D., ยินดี กิตยานันท์,  
 D.V.M.,M.Sc., ประพีร์ เศรษฐรักษ์, Ph.D., แสงชัย พฤทธิพันธ์, MD. 78 หน้า. ISBN 974-663-  
 578-6

วิธีการว่ายน้ำและการปั่นด้วยน้ำยาเปอร์คอลล เป็นวิธีการเตรียมเซลล์อสุจิที่นิยมมาก  
 ในห้องปฏิบัติการช่วยการเจริญพันธุ์ ข้อดีของเซลล์อสุจิที่ได้จากการเตรียมทั้ง 2 วิธีนี้ยังไม่มีข้อ  
 สรุปีที่แน่นอน การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบผลสัมฤทธิ์ของการเตรียมเซลล์อสุจิ  
 ของโคและกระบือด้วยวิธีการทั้งสองครรรชนี การวัดผลที่ได้ ได้แก่ ความเข้มข้น การเคลื่อนไหว  
 รูปร่างและปฏิกิริยาอะโครโซมของเซลล์อสุจิ แบ่งน้ำเชื้อที่ได้จาก พ่อพันธุ์โคและกระบือออกเป็น  
 สองส่วนเท่าๆกัน ส่วนหนึ่งใช้ศึกษาด้วยวิธีการว่ายน้ำ และอีกส่วนหนึ่งสำหรับการปั่นแยกด้วยน้ำ  
 ยาเปอร์คอลล วิธีการว่ายน้ำทำให้ได้เปอร์เซ็นต์ของการเคลื่อนไหวและรูปร่างปกติของเซลล์อสุจิ  
 สูงกว่าวิธีการปั่นแยกด้วยน้ำยาเปอร์คอลลทั้งในโค (เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหว 94.96 vs 76.88 :  
 รูปร่างปกติ 72 vs 70.60) และในกระบือ (เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหว 95.75 vs 75.02 : รูปร่างปกติ  
 77.49 vs 74.91) ในขณะที่วิธีการหลังให้ความเข้มข้นของเซลล์อสุจิ ( $\times 10^6$  cells/mL) ในโคสูงกว่า  
 (3.67 vs 6.03) แต่เท่ากันทั้งสองวิธีในกระบือ (7.14 vs 6.98) อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ไม่พบ  
 ความแตกต่างของการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิทั้งโคและกระบือภายหลังการเตรียมด้วยวิธีการทั้ง  
 สอง (โค; 3.9 vs 3.87 : กระบือ; 7.14 vs 6.98) นอกจากนี้ยังได้ศึกษาปฏิกิริยาอะโครโซมของเซลล์  
 อสุจิทั้งโคและกระบือด้วยสารเคมีเฮฟพาริน และตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาด้วยสารเรืองแสงฟีนท  
 แอกลูตินิน พบว่าปฏิกิริยาอะโครโซมเกิดขึ้นกับเซลล์อสุจิในโคมากกว่ากระบือ จากการ เตรียม  
 เซลล์อสุจิทั้งสองวิธี

จากผลการทดลอง พบว่า เซลล์อสุจิของโคและกระบือมีคุณภาพด้วยเปอร์เซ็นต์การ  
 เคลื่อนไหว รูปร่างเซลล์ปกติ และพบว่าการเคลื่อนไหวภายหลังจากการเตรียมทั้งสองวิธีดีกว่าน้ำ  
 เชื้อที่ยังไม่ผ่านขั้นตอนของวิธีการทั้งสอง เปอร์เซ็นต์ของการเคลื่อนที่และรูปร่างของเซลล์ปกติจะ  
 สูงกว่าในวิธีการว่ายน้ำ ยกเว้นความเข้มข้นของเซลล์อสุจิจะมีมากกว่าในวิธีการปั่นแยกด้วยน้ำยา  
 เปอร์คอลล ที่ถ้าด้วยสารเฮฟพารินทำให้เกิดปฏิกิริยาอะโครโซมของเซลล์อสุจิของโคมากกว่า  
 กระบืออย่างมีนัยสำคัญจากการตรวจสอบด้วยสารเรืองแสงฟีนท แอกลูตินิน.