نشریه علوم دامی
(پژوهش و سازندگی)

شماره ۱۰۶، بهار ۱۳۹٤
ص‌ص: ٥٥~٦٤

تاثیر نوع رقیق کننده و لام برروی ارزیابی تحرک اسپرم بز با استفاده از CASA

- **سعدی کریم زاده**
دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم دامی، دانشگاه ارومیه.
- **فرهاد فرخی اردبیلی** (نویسنده مسئول)
دانشیار، دانشگاه ارومیه.

تاریخ دریافت : آبان ۹۱ تاریخ پذیرش : شهریور ۹۳

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۴۳۴۳۷۶۶۸

Email: f.farrokhi@urmia.ac.ir

چکیده

سیستم آنالیز اسپرم با کمک کامپیوتر (CASA) بعنوان روشی دقیق و غیر ذهنی برای ارزیابی تحرک اسپرم بکار می رود. تحقیق حاضر به منظور بررسی و ارزیابی تأثیر نوع رقیق کننده و نوع لام مخصوص ارزیابی تحرک اسپرم (اسپرم چمبر) بر روی نتایج بدست آمده از سیستم CASA در بز انجام گرفت. نمونه‌های منی از ٥ راس بز اکوتیپ مهابادی با استفاده از واژن مصنوعی جمع آوری گردیدند. نمونه ها با دو نوع رقیق کننده بایوکسل و آندرومد به میزان ٦ میلیون اسپرم در هر میلی لیتر رقیق گردیدند. نمونه های رقیق شده با استفاده از دو نوع مختلف اسپرم چمبر شامل لام Makler و لام Leja و همچنین لام معمولی توسط یک دستگاه میکروسکوپ فاز کنتراست سه چشمی متصل به سیستم CASA مورد مشاهده قرار گرفتند. پارامترهای حرکتی اسپرم که محاسبه و ثبت گردید عبارت بودند از : سرعت حرکت در مسیر میانگین (VAP, µm/s)، سرعت حرکت در مسیر مستقیم (VSL, µm/s)، سرعت حرکت در مسیر منحنی (VCL, µm/s)، دامنه نوسان سر (ALH, µm) ، تعداد نوسان سر (BCF, Hz)، نسبت VSL به VAP (STR)، و مستقیم الخط بودن (LIN= VSL/VCL %). نوع رقیق کننده بر روی تمامی پارامترهای حرکتی اسپرم به جز سرعت اسپرم در مسیر واقعی (VCL) اثر معنی دار داشت. در نمونه های منی رقیق شده در بایوکسل میانگین فراسنجه های VSL، VAP، BCF، LIN و STR بطور معنی داری بیشتر و فراسنجه ALH کمتر از منی رقیق شده در آندرومد بود ($P<0.05$). تاثیر نوع لام تنها در دو فراسنجه LIN و BCF دارای اثر معنی دار بود. با توجه به نتایج این تحقیق، نوع رقیق کننده برروی ارزیابی تحرک اسپرم توسط CASA تاثیر قابل توجهی داشت در حالیکه نوع اسپرم چمبر مورد استفاده در سیستم CASA تاثیری برروی پارامترهای تحرک اسپرم نداشت.

واژه‌های کلیدی: رقیق کننده، بز، تحرک اسپرم، اسپرم چمبر، CASA.

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 106 pp: 55-64

Effects of extender and sperm chamber on computer-assisted analysis of sperm motility (CASA) in goats

By:
1: Saadi Karimzade, M.Sc Graduated in Animal physiology,university of Urmia, Urmia,Iran.
2: Farhad Farrokhi Ardebili*, Associate professor, Department of Animal Science, Urmia *
Corresponding Author: f.farrokhi@urmia.ac.ir , Tel: +98 9143437668

Received: November 2012 **Accepted: September 2014**

Computer-assisted semen analysis (CASA) is used as an accurate and objective tool for kinetic sperm measurements. The aims of this study were evaluate the effects of extender and sperm chamber on motility parameters of goat sperm using CASA. Semen collected from five Mahabadi goats via artificial vagina. The collected semen divided in two fractions and diluted in two commercially soyabean based extender, Bioxcell and Andromed to finally concentration of 6×10^6 spermatozoa per ml. The diluted semen evaluated via CASA and using two sperm chambers including Makler chamber with 10µm deep and Leja chamber with 20µm deep, and microscopic slide with 18*18mm cover. The motility parameters considered in this study were average path velocity (VAP, µm/s), straight line velocity (VSL, µm/s), curvilinear velocity (VCL, µm/s), amplitude of lateral head displacement (ALH, µm), beat cross frequency (BCF, Hz), straightness (STR, as VSL/VAP, %), and linearity (LIN, as VSL/VCL, %). The medium used for the dilution of the sample significantly affects all sperm motility parameters except VCL. Only ALH was significantly lower ($P < 0.05$), whereas VSL, VAP, BCF LIN and STR were significantly higher, in the semen diluted in Bioxcell than Andromed. The effects of sperm chamber were significant only in LIN and BCF. In conclusion the extender had significant effect on the CASA results whereas sperm chamber didn't has so effects.

Key words: Extender, Goat, Sperm Motility, Sperm chamber, CASA.

مقدمه

ارزیابی تحرک اسپرم یکی از مهمترین روش های آزمایشگاهی تخمین باروری منی دام نر می باشد (Budworth et al. 1988). تا چند سال اخیر، متداولترین روش برای تعیین کیفیت تحرک اسپرم، ارزیابی ذهنی از طریق مشاهده منی خام یا رقیق شده توسط میکروسکوپ نوری بود. در هنگام استفاده از روش ارزیابی ذهنی تحرک اسپرم با میکروسکوپ نوری در انسان و دام ها، نوسان ۷۰-۳۰٪ در تعیین پارامترهای حرکتی یک نمونه انزال گزارش شده است (Verstegen, 2002; Amann, 1989). به عبارت دیگر، این روش برای ارزیابی تحرک اسپرم دقت زیادی نداشته و قضاوت ذهنی تحرک اسپرم تا حدود زیادی بستگی به تجربه و مهارت فرد ارزیابی کننده داشته و در غالب موارد منجر به عدم توافق بین آزمایشگاههای مختلف در هنگام بررسی یک نمونه می‌گردد. اما استفاده از روشهای غیر ذهنی باعث از بین رفتن خطای حاصل از مهارت و تجربه فرد ارزیابی کننده می‌شود (Verstegen, 2002). روش آنالیز کامپیوتری اسپرم (CASA)، یکی از روش های جدید و دقیق ارزیابی اسپرم می‌باشد که در طی دو دهه اخیر معرفی شده و در این مدت پیشرفت قابل توجهی داشته است. CASA این امکان را فراهم می‌نماید که برآورد درستی از ویژگیهای اسپرم از قبیل مورفولوژی و حرکت اسپرم به دست آید. استفاده از این سیستم خطاهای فردی را در ارزیابی تحرک اسپرم به حداقل می‌رساند (Verstegen, 2002; Dorado et al 2006; Varner et al 1991). با استفاده از سیستم CASA علاوه بر تعیین غلظت نمونه، می‌توان اسپرم‌ها را بر اساس نوع حرکتشان تقسیم بندی کرد. علیرغم دقت زیاد سیستم CASA در ارزیابی نمونه‌ی منی، عواملی مانند دمای صفحه‌ی گرم کن میکروسکوپ، نوع میکروسکوپ، نوع رقیق کننده، نوع لام، تعداد فیلد برای آنالیز، تعداد فریم و غلظت اسپرم می‌توانند نتایج ارزیابی نمونه‌ی منی را تحت تأثیر قرار دهند. اثر غلظت اسپرم بر روی نتایج به دست آمده بسیار قابل توجه می‌باشد. مایع منی قبل از تجزیه و تحلیل باید رقیق شود زیرا غلظت

سلولهای اسپرم منی رقیق نشده برای تجزیه و تحلیل انفرادی و درست اسپرماتوزوئید بسیار بالا است. برای رقیق سازی منی نبایستی از محلول هایی استفاده کرد که دارای ذرات با اندازه مشابه سر اسپرم هستند (Iguer-Ouada and Verstegan, 2001). در یک مطالعه، تأثیر محیط و روشهای رقیق‌سازی در CASA بر روی انسان، خرگوش و گاو بررسی شد. از ۳ نوع رقیق‌کننده PBS حاوی گلوکز و BSA، TALP، K-TALP استفاده کردند و در ساعات ۰، ۱ و ۲ بعد از رقیق‌سازی مشاهده شد که در اسپرم انسان اختلاف اندکی در فراسنجه‌های مختلف ارزیابی شده توسط CASA در بین ۳ رقیق کننده وجود داشت (Farrell et al., 1996). با توجه به تاثیر روش های رقیق سازی و آماده سازی نمونه منی برروی نتایج CASA ، ضروری است تا به منظور به حداقل رساندن اثر این عوامل ، روش های استانداردی برای آماده سازی نمونه ها تدوین گردد.

هدف از تحقیق حاضر، ارزیابی تأثیر نوع رقیق کننده و نوع لام مورد استفاده (اسپرم چمبر) برروی ارزیابی تحرک اسپرم بز توسط سیستم CASA می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق، از ۵ رأس بز نژاد مهابادی دو ساله که در شرایط محیطی یکسان و در دامداری گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه واقع در ۱۱ کیلومتری شمال غرب شهرستان ارومیه (N37°39′02″; E 44°59′06″) نگهداری می‌شدند، استفاده شد. جمع آوری منی از بزهای نر توسط واژن مصنوعی و با استفاده از یک رأس بز ماده فحل انجام گرفت. در این مطالعه، از نمونه‌های منی استفاده گردید که حداقل حجم ۰/۷۵ میلی لیتر، غلظت اسپرم بیش از ۲/۵ میلیارد در هر میلی لیتر ، حرکت پیشرونده بیش از ۷۰٪ و کمتر از ۱۰٪ اسپرم غیر طبیعی بود. نمونه‌هایی که در ارزیابی اولیه مورد تأیید قرار گرفته بودند در بن ماری ۳۷ درجه سانتی گراد تا مراحل بعدی آزمایش‌ها نگهداری شدند. نمونه‌های جمع‌آوری شده به منظور ازبین بردن اثر دام نر، با یکدیگر مخلوط شده و سپس به میزان ۶ میلیون اسپرم در هر میلی لیتر رقیق گردیدند. برای رقیق سازی از دو نوع رقیق کننده تجاری بر پایه ترکیبات گیاهی (سویا) شامل بایوکسل (Bioxcell IMV TECHNOLOGIES,CODE ARTICLE:016218) و آندرومد (AndroMed; Minitüb; REF: 13503/0200) استفاده گردید. در هر رقیق کننده، ارزیابی اسپرم ها با استفاده از سه نوع لام انجام گرفت. این لام ها عبارت بودند از : لام معمولی با ابعاد ۷۶/۲ × ۲۵/۴ و ضخامت ۱/۲-۱ میلی متر و لامل ۱۸ × ۱۸ و ضخامت ۰/۱۶-۰/۱۳ میلی متر، اسپرم چمبر مدل مکلر (Sperm meter, Sperm processor, India) با عمق ۱۰ میکرومتر و اسپرم چمبر لیجا (Leja Products B. V., Nieuw-Vennep, The Netherlands) با عمق ۲۰ میکرومتر. نمونه‌ها پس از بارگذاری در هر لام توسط میکروسکوپ فاز کنتراست (Labomed LX400) مجهز به دوربین فیلم برداری متصل به کامپیوتر توسط نرم افزار (CASA Sperm 2.1 , VideoTest, Russia) ارزیابی گردید. برای افزایش سرعت و دقت، ابتدا از تمامی نمونه های آزمایشی با استفاده از دستگاه ضبط DVD فیلم برداری شده و سپس فیلم ها مورد ارزیابی توسط CASA قرار گرفتند. در این آزمایش از هر تکرار دو لام و از هر لام حداقل ۴ فیلد و در کل حداقل ۱۰۰ اسپرم مورد آنالیز قرار گرفتند. فراسنجه‌های حرکتی که توسط سیستم CASA برای اسپرم ها محاسبه گردید عبات بودند از :

سرعت در مسیر منحنی (VCL (µm/sec)) ، سرعت در مسیر میانگین (VAP (µm/sec)) ، سرعت در مسیر مستقیم (VSL (µm/sec)) ، دامنه نوسانات سر اسپرم (ALH(µm)) ، فرکانس نوسانات سر اسپرم (BCF (Hz)) ، نسبت سرعت در مسیر مستقیم به سرعت مسیر میانگین (STR(%))، نسبت سرعت در مسیر مستقیم به سرعت مسیر منحنی (LIN(%))

این آزمایش در قالب طرح فاکتوریل ۲×۳ در ۵ تکرار (تعداد دفعات نمونه‌گیری) انجام گرفت. تجزیه آماری توسط نرم افزار آماری SAS (نسخه 9.1) و رویه GLM صورت گرفت. مقایسه میانگین‌ها در این قسمت با آزمون Tukey انجام شد.

مدل آماری تجزیه داده ها به شرح زیر می باشد :

$$Y_{ijk} = \mu + \delta_j + \delta_k + \delta_{jk} + \varepsilon_{ijk}$$

در این فرمول Y_{ijk} نشان دهنده هر مشاهده، μ میانگین کل، δ_j اثر رقیق کننده، δ_k اثر لام، δ_{jk} اثر متقابل رقیق کننده در لام و ε_{ijk} اشتباه آزمایش می باشد.

نتایج

نتایج تجزیه واریانس این آزمایش در جدول ۱ نشان داده شده است. همانطورکه مشاهده می شود، نوع رقیق کننده بر روی تمامی فراسنجه‌های حرکتی اسپرم به جز سرعت اسپرم در مسیر واقعی (VCL) اثر معنی‌دار دارد در صورتیکه نوع لام تنها در دو فراسنجه LIN و BCF دارای اثر معنی‌دار بود. اثر متقابل رقیق کننده در لام نیز در هیچکدام از این فراسنجه‌ها معنی‌دار نبود.

میانگین فراسنجه‌های حرکتی مختلف اسپرم‌های ارزیابی شده توسط سه نوع چمبر مختلف (Makler، Leja و لام معمولی) در جدول۲ نشان داده شده است. همانطورکه مشاهده می‌شود، تغییرات مقادیر پارامترهای VAP، VSL، VCL، ALH و STR در اسپرم‌های ارزیابی شده با این سه نوع چمبر تفاوت معنی‌داری نداشت و تنها در فراسنجه‌های BCF و LIN اختلاف معنی‌دار مشاهده گردید. میانگین تعداد نوسانات جانبی سر اسپرم در نمونه‌های ارزیابی شده بوسیله لام معمولی بطور معنی‌داری بیشتر از تعداد نوسانات سر در چمبرهای Makler بود (به ترتیب ۰/۱۷±۹/۲، ۰/۱۶±۸/۹ و ۰/۱۸±۸/۸ در لام معمولی، Makler و Leja). پارامتر LIN نیز در اسپرم‌های ارزیابی شده در چمبر Makler به میزان معنی داری بیشتر از لام معمولی بود (به ترتیب ۴۶/۸٪ و ۴۱٪).

میانگین LIN و STR اسپرم های آنالیز شده در دو نوع رقیق کننده ی بایوکسل و آندرومد در نمودار ۱ نشان داده شده است . همانطور که مشاهده می شود، مقادیر LIN و STR در رقیق کننده ی بایوکسل نسبت به رقیق کننده ی آندرومد بطور معنی داری بیشتر است (مقادیر LIN و STR به ترتیب ۱/۷۷±۵۴/۰٪ و ۱/۴۹±۸۷/۳٪ در بایوکسل و ۱/۴۱±۳۳/۶٪ و ۱/۹۶±۸۰/۶٪ در آندرومد)($P<0.01$) . میانگین تعداد نوسانات جانبی سر اسپرم (BCF) و دامنه نوسانات جانبی سر اسپرم (ALH) در نمونه های رقیق شده با دو نوع رقیق کننده بایوکسل و آندرومد در نمودار ۲ مشاهده می شود. هر دو پارامتر BCF و ALH در اسپرم های رقیق شده در بایوکسل بطور معنی داری بیشتر از اسپرم های رقیق شده در آندرومد بود. در مورد پارامترهای نشان دهنده سرعت حرکت اسپرم، نوع رقیق کننده اثر معنی داری در پارامترهای سرعت حرکت اسپرم در مسیر میانگین (VAP) و مسیر مستقیم (VSL) داشت در صورتیکه میانگین سرعت اسپرم در مسیر واقعی (VCL) بین دو رقیق کننده اختلاف معنی داری را نشان نداد (نمودار ۳).

بحث

تحرک، یکی از مهمترین پارامترهای مورد استفاده جهت ارزیابی کیفیت اسپرم در نمونه های تازه و منجمد منی می باشد. ارزیابی تحرک اسپرم، اطلاعات مهمی از وضعیت انرژی اسپرم پستانداران فراهم می سازد(Quintero-Moreno et al. 2004). همچنین زمانی که اسپرم به محل اتصال اویدوکت به رحم (که حاوی موکوس بوده و می تواند بعنوان سدی عمل کند) می‌رسد، تحرک اسپرم نقش مهمی را ایفا می کند (Contri et al. 2010).

براساس نتایج بدست آمده، تنها در دو پارامتر LIN و BCF تفاوت معنی دار بین سه نوع لام مشاهده گردید و از لحاظ سایر پارامترهای تحرک اسپرم، اختلاف معنی داری مشاهده نگردید (جدول ۲). نوع اسپرم چمبر جزء عواملی است که می‌تواند برروی نتایج آنالیز اسپرم بوسیله‌ی CASA تأثیر گذار باشد. چمبر یکی از منابع ایجاد خطا در روش CASA و همچنین در ارزیابی دستی اسپرم می‌باشد میزان خطا ممکن است به علت دستکاری مکرر، تمیز کردن و غیره افزایش پیدا کند. ویژگی اصلی اسپرم چمبرها عمق آن می‌باشد که بسیار حائز اهمیت است. عمق چمبر می تواند از طریق مواردی مانند محدود کردن جا به جایی اسپرم و یا برهمکنش اسپرم با دیواره‌های چمبر، بر حرکات اسپرم تأثیر

بگذارد. اسپرم چمبرهایی با عمق ۱۰، ۱۲، ۲۰ و ۵۰ میکرومتر در گونه‌های مختلف ارزیابی شده‌اند و تمامی آنها ظاهراً نتایج مشابهی را در آنالیز تحرک داشتند (Verstegen et al., 2002). Iguer- Ouada و همکاران (۲۰۰۱) در تحقیقی، دو نوع اسپرم چمبر شامل نوع Makler با عمق ۱۰ میکرون و نوع Cell-vu با عمق ۲۰ میکرون را از نظر فراسنجه‌های حرکتی و شمارش اسپرم سگ مقایسه نمودند. فراسنجه‌های حرکتی بدست آمده با استفاده از لام Makler بطور معنی داری متفاوت با لام Cell-vu بود. بعبارت دیگر در تحقیق فوق، اسپرم چمبر Cell-vu اثر مهاری بر روی فراسنجه‌های تحرکی اسپرم سگ نشان داد. Iguer-Ouada معتقد بود که این اثر مهاری را نمی‌توان ناشی از عمق اسپرم چمبر دانست چون عمق Cell-vu بیشتر از عمق Makler بود (به ترتیب ۲۰ و ۱۰ میکرون) و انتظار می‌رفت تا حرکت اسپرم‌ها در آن راحت تر انجام شود. آنها معتقد بودند که با توجه به یکسان بودن شرایط آزمایش درهر دو اسپرم چمبر، احتمالاً ناسازگاری برخی عوامل یا مواد در این اثر دخالت داشتند. در مطالعه ای دیگر، Contri و همکاران (۲۰۱۰) دو نوع اسپرم چمبر (Leja و Mekler) را برروی نتایج CASA در اسپرم های منجمد گاو مقایسه کردند و بین دو لام نه تنها در مورد پارامترهای حرکتی بلکه در درصد اسپرم های متحرک و دارای حرکت پیشرونده نیز اختلاف معنی داری مشاهده کردند. برخلاف دو گزارش اخیر، در تحقیق حاضر در هیچیک از پارامترهای تحرک اسپرم بین چمبرهای Leja و Makler اختلاف معنی داری مشاهده نگردید. براساس نتایج این تحقیق، در نمونه های تازه منی بز که با آندرومد یا بایوکسل رقیق شده اند، اثرات ناشی از دینامیک مایعات و عمق چمبر بین دو نوع لام به اندازه ای نیست که بتواند تاثیر قابل توجهی بر روی پارامترهای تحرک داشته باشد. در این تحقیق همچنین تاثیر استفاده از لام معمولی در مقایسه با اسپرم چمبرهای اختصاصی (Leja و Makler) برروی پارامترهای محاسبه شده توسط CASA ارزیابی گردید. در اکثر پارامترهای تحرک اسپرم، تفاوت قابل توجهی مشاهده نگردید و تنها در LIN و BCF این اختلاف معنی دار بود. مهمترین تفاوت لام معمولی با Leja و Makler در نا مشخص و غیر قابل کنترل بودن عمق آن می باشد. با این وجود نتایج آزمایش نشان داد که در منی تازه بز که با آندرومد و یا بایوکسل رقیق شده باشد، از لام معمولی می توان به جای چمبرهای اختصاصی برای آنالیز تحرک اسپرم ها با CASA استفاده کرد.

هدف استفاده از رقیق کننده، کاهش غلظت اسپرم در نمونه مورد آزمایش تا حدی است که سیستم CASA بتواند مسیر حرکت اسپرم ها را بدون تداخل با یکدیگر شناسایی و پارامترهای حرکتی را محاسبه کند و این امر در ارزیابی منی نشخوارکنندگان که دارای غلظت بسیار بالای اسپرم هستند، ضروری تر می‌باشد. رقیق کننده هایی که برای نگهداری اسپرم بصورت مایع و یا منجمد استفاده می شوند بدلیل دارا بودن منبع انرژی، سیستم بافرینگ قوی، ترکیبات محافظت کننده و توانایی حفظ کیفیت تحرک اسپرم ها در طی مدت زمان مورد نیاز، می توانند محلول هایی مناسب برای رقیق سازی نمونه منی جهت آنالیز توسط CASA باشند. بایوکسل و آندرومد دو نوع از رقیق کننده های بر پایه سویا هستند که برای نگهداری اسپرم دام های مختلف بصورت مایع و منجمد مورد استفاده قرار گرفته اند. مطالعه ای در مورد کارایی این رقیق کننده در استفاده از آن برای CASA وجود ندارد. در مطالعه حاضر، در نمونه های منی بز رقیق شده در بایوکسل، تمامی پارامترهای حرکتی اسپرم (بغیر از VCL) تفاوت معنی داری را با نمونه های رقیق شده با آندرومد نشان دادند. میانگین VAP و VSL اسپرم های رقیق شده در بایوکسل بطور معنی داری بیشتر از اسپرم های رقیق شده در آندرومد بود در صورتیکه میانگین VCL اختلاف معنی داری را نشان نداد (نمودار ۳). در رابطه با پارامترهای نشان دهنده الگوی حرکتی اسپرم ها نیز، مقادیر LIN و STR در منی رقیق شده در بایوکسل بطور معنی داری بیشتر از آندرومد بود (نمودار ۱). پایین بودن قابل توجه LIN در اسپرم های رقیق شده در آندرومد به دلیل پایین بودن درصد اسپرم های دارای حرکت پیشرونده نیست بلکه ناشی از بیشتر بودن دامنه نوسان جانبی سر اسپرم(ALH) می باشد. در مقالات مختلف به تاثیر نوع رقیق کننده برروی پارامترهای حرکتی اسپرم اشاره شده

است. Farrell و همکاران (۱۹۹۶) در مطالعه‌ای برروی پارامترهای حرکتی اسپرم خرگوش رقیق شده در سه نوع رقیق کننده مختلف، اثرات محیط رقیق کننده را برروی تحرک اسپرم قابل توجه گزارش کردند ولی در انسان اختلاف معنی داری مشاهده نگردید. Tardif و همکاران در سال۱۹۹۷ در اسپرم های گاو نگهداری شده در سه نوع رقیق کننده TALP، CUE و زرده تخم مرغ-تریس، اختلاف معنی داری را در پارامترهای تحرکی ارزیابی شده توسط سیستم CASA گزارش کردند. Schafer-Sami و همکاران نیز در سال ۲۰۰۷ در مطالعه ای که بوسیله CASA برروی منی سگ و با استفاده از ۴ نوع رقیق کننده انجام گرفت اثرات نوع رقیق کننده را برروی پارامترهای ارزیابی شده توسط CASA، متفاوت گزارش کردند. در مطالعه Cox و همکاران در سال ۲۰۰۶ که توسط CASA برروی ارزیابی کیفیت حرکت اسپرمهای منی رقیق شده بز نر در پلاسمای منی و محیط آنالیز اسپرم (SAM) انجام گرفت، پارامترهای سرعتی اسپرم در پلاسمای منی بطور قابل توجهی کمتر از محیط آنالیز اسپرم بود. در مطالعه Robayo و همکاران در سال ۲۰۰۸ در قوچ نیز پارامترهای سرعتی حرکت اسپرم های رقیق شده در پلاسمای منی بطور قابل توجهی کمتر از اسپرم های رقیق شده در محیط آنالیز اسپرم بود. مصطفی پور در سال ۱۳۸۸، تاثیر سه نوع رقیق کننده شامل پلاسمای منی، BPS و بایوکسل را برروی پارامترهای حرکتی اسپرم های قوچ ارزیابی کرد. براساس نتایج بدست آمده از مطالعه مزبور، پارامترهای حرکتی اسپرم در قوچ تحت تاثیر نوع رقیق کننده قرار داشت و بایستی در هنگام ارزیابی تحرک اسپرم های قوچ توسط سیستم CASA توجه نمود که نوع رقیق کننده می تواند بعنوان عامل موثر برروی پارامترهای تحرکی اسپرم باشد. همچنین با توجه به تاثیر معنی دار زمان برروی کیفیت تحرک اسپرم ها، توصیه گردید تا اگر فاصله زمانی بین جمع آوری و رقیق سازی نمونه ها تا آنالیز توسط CASA زیاد باشد، از رقیق کننده های حاوی مواد مغذی و ترکیبات بافری مناسب استفاده نمود. البته در مورد منی بز توصیه می شود تا در صورت استفاده از رقیق کننده های حاوی لسیتین (مانند رقیق کننده های حاوی زرده تخم مرغ یا سویا) فاصله بین نمونه گیری تا آنالیز تحرک اسپرم ها تا حد امکان کوتاه باشد و بایستی توجه داشت که در صورت طولانی شدن این مدت، اثرات سوء آنزیم های موجود در پلاسمای منی برروی لسیتین رقیق کننده ها، می تواند به میزان قابل توجهی باعث تضعیف حرکت اسپرم ها گردد. در مطالعه حاضر، اختلاف پارامترهای تحرکی اسپرم بین دو رقیق کننده بایوکسل و آندرومد بسیار قابل توجه بود. این نتایج نشان می دهد که برای اسپرم های رقیق شده در بایوکسل و آندرومد بایستی از لحاظ پارامترهای تحرکی، استانداردهای جداگانه ای تعیین و تعریف نمود و مقایسه نمونه های منی رقیق شده در محیط های مختلف با استاندارد یکسان، موجب بروز خطا در ارزیابی خواهد گردید. از لحاظ درصد شناسایی و آنالیز اسپرم توسط سیستم CASA، هر دو رقیق کننده توانایی خوبی داشتند ولی ذرات موجود در آندرومد در غالب موارد توسط سیستم به اشتباه بعنوان اسپرم شناسایی می گردید و برای اجتناب از بروز خطا در آنالیز نمونه منی ضروری بود تا ذرات شناسایی شده از داده های سیستم حذف گردد که این کار موجب افزایش مدت زمان مورد نیاز برای آنالیز نمونه می گردید. چنین مشکلی در نمونه های رقیق شده در بایوکسل مشاهده نگردید.

نتیجه‌گیری

بطور کلی، بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق پارامترهای حرکتی اسپرم (محاسبه شده توسط CASA) تحت تاثیر نوع رقیق کننده قرار دارد که بایستی در هنگام ارزیابی منی توسط CASA به آن توجه داشت و توصیه می شود تا با مطالعه بیشتر برروی شدت تاثیر رقیق کننده های مختلف دیگر، ضرورت تعریف استانداردهای جداگانه با توجه به نوع رقیق کننده برای ارزیابی منی توسط CASA مشخص گردد. همچنین نتایج بدست آمده نشان دادند که نوع لام مورد استفاده در سیستم CASA تاثیر قابل توجهی برروی پارامترهای تحرک اسپرم نداشت و به همین دلیل از لام معمولی می توان بعنوان جایگزین اسپرم چمبرهای مکلر و لیجا در ارزیابی منی با سیستم CASA استفاده کرد.

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس فراسنجه‌های مختلف محاسبه شده توسط سیستم CASA در منی بز با استفاده از دو رقیق کننده و سه نوع لام مختلف.

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات پارامترهای حرکتی مختلف اسپرم						
		LIN	STR	BCF	ALH	VCL	VSL	VAP
رقیق کننده	1	3100.8^{**}	329.3^{**}	5.0^{**}	1.8^{**}	9612.3^{**}	8283.4^{**}	572.0^{ns}
لام	2	84.9^{**}	68.5^{ns}	0.3^{**}	0.1^{ns}	126.4^{ns}	337.2^{ns}	1772.4^{ns}
رقیق کننده × لام	2	34.6^{ns}	100.3^{ns}	$>0.1^{ns}$	$>0.1^{ns}$	38.7^{ns}	37.4^{ns}	0.7^{ns}
خطا	20	286.1	576.1	0.5	2.3	1494.6	1889.5	11285.2
CV	---	8.6	6.4	1.8	17.8	13.5	13.4	16.8

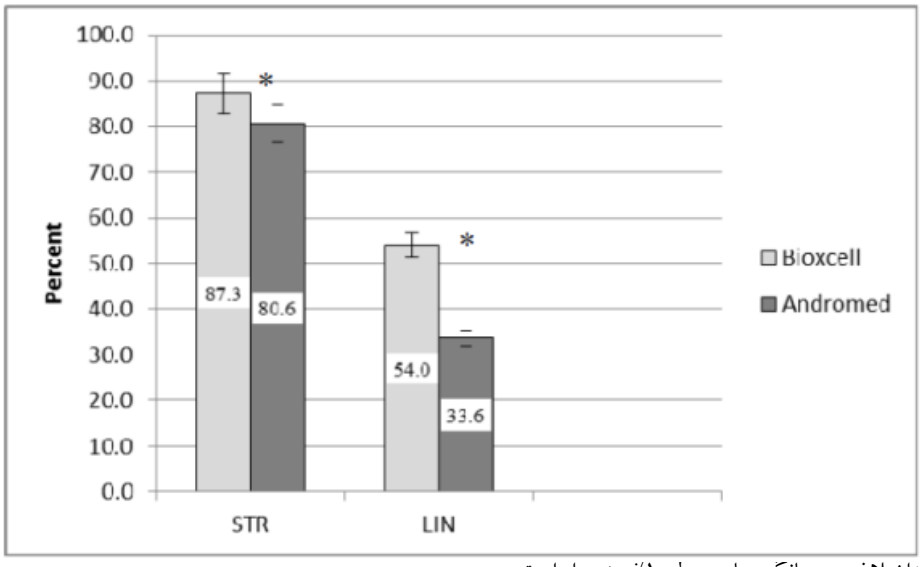
^{ns} غیرمعنی‌دار؛ *اختلاف بین میانگین‌ها در سطح ۵٪ معنی‌دار است؛ ** اختلاف بین میانگین‌ها در سطح ۱٪ معنی‌دار است

جدول ۲- میانگین فراسنجه‌های حرکتی اسپرم (± SE) محاسبه شده توسط CASA در منی بز با استفاده از اسپرم چمبرهای Mackler، Leja و لام معمولی.

	LIN (%)	STR (%)	BCF (Hz)	ALH (µm)	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)
Mackler	46.8 ± 5.58^{a}	86.9 ± 2.57	8.9 ± 0.16^{a}	1.8 ± 0.13	126.7 ± 5.77	60.1 ± 7.45	65.6 ± 7.07
Leja	43.7 ± 3.39^{ab}	82.8 ± 1.86	8.8 ± 0.18^{a}	2.0 ± 0.10	146.3 ± 5.12	65.9 ± 6.60	75.4 ± 6.49
Slide	41.0 ± 3.47^{b}	82.1 ± 2.51	9.2 ± 0.17^{b}	1.9 ± 0.15	152.0 ± 10.69	66.5 ± 7.30	75.8 ± 7.03

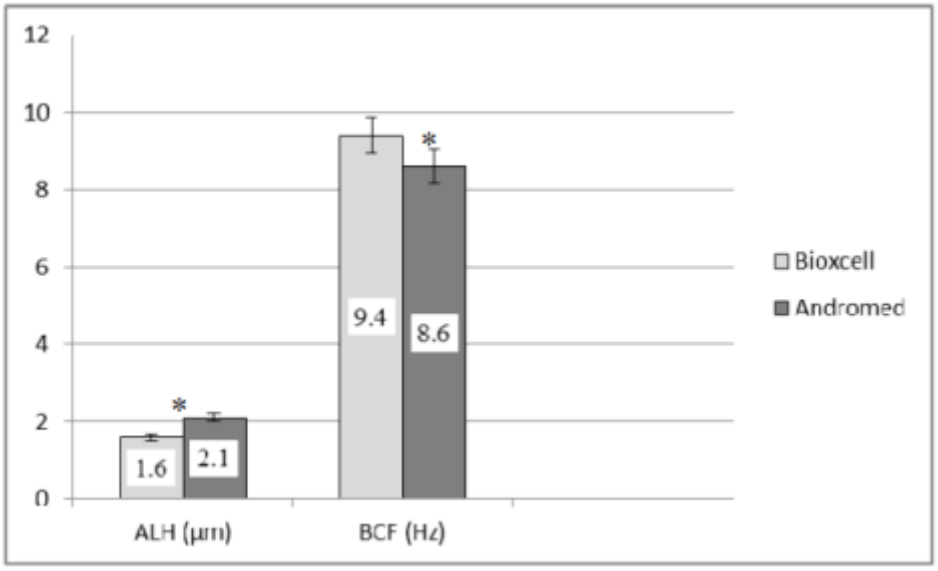
در هر ستون میانگین هایی با حروف متفاوت مشخص شده اند دارای اختلاف معنی دار هستند($P< 0.05$).

نمودار ۱- مقایسه میانگین پارامترهای LIN و STR در اسپرم های رقیق شده با بایوکسل و آندرومد



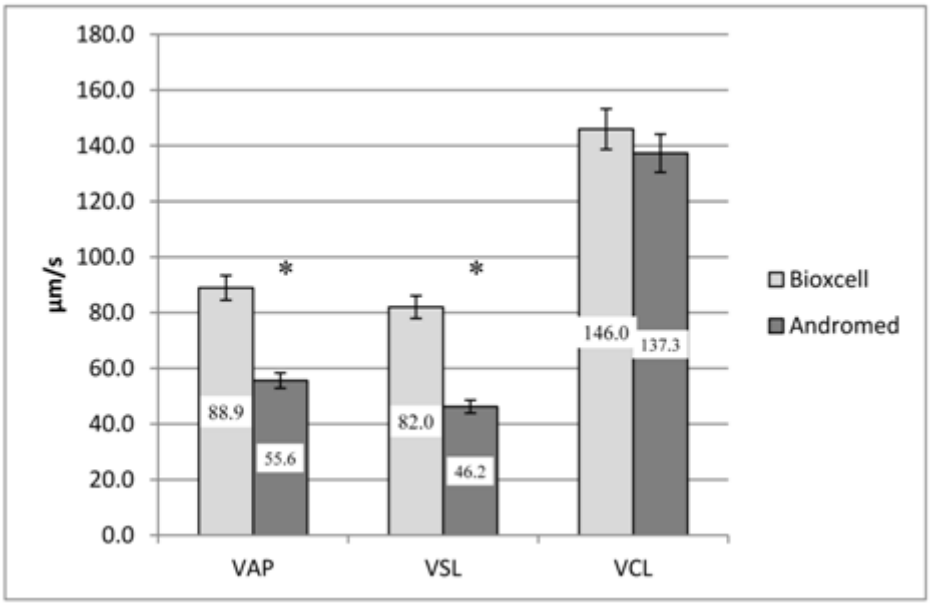
*اختلاف بین میانگین ها در سطح ۱٪ معنی دار است.

نمودار ۲- میانگین پارامترهای BCF و ALH در اسپرم های رقیق شده با بایوکسل و آندرومد.



*اختلاف بین میانگین ها در سطح ۱٪ معنی دار است.

نمودار۳- میانگین پارامترهای مربوط به سرعت حرکت اسپرم (VCL، VSL و VAP)در نمونه های رقیق شده با بایوکسل و آندرومد .



*اختلاف بین میانگین ها در سطح ۱٪ معنی دار است

منابع

۱- مصطفی پور، س (۱۳۸۸) مطالعه تأثیر نوع رقیق کننده، میزان رقیق سازی و مدت نگهداری منی در آنالیز کامپیوتری تحرک اسپرم قوچ، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه ارومیه. شماره پایان نامه: ۱۱۹-۲ک.

Amann, R. (1989). Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately. Journal Androl, Vol, 10, No, 2. pp: 89-98.

Budworth, P. Amann, R. and Chapman, P. (1988). Relationships between computerized measurements of motion of frozen thawed bull spermatozoa and fertility. Journal Androl, Vol, 9, No, 1. pp:41-54.

Contri, A. Valoizb, C. Faustinic, M. Wegherb, L. and Carluccioa A. (2010). Effect of semen preparation on casa motility results in cryopreserved bull spermatozoa. Theriogenology, Vol, 74, No, 3. pp: 424–435.

Cox, J. Alfaro, V. Montenegro, H. and Rodriguez- Martinez, H. (2006). Computer-assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical mucus. Theriogenology, Vol, 66, No. pp: 860- 867.

Dorado, J. Rodriguez, I. and Hidalgo, M. (2007). Cryopreservation of goat spermatozoa: Comparison of two freezing extenders based on post-thaw sperm quality and fertility rates after artificial insemination. Theriogenology, Vol, 68, No, 2. pp: 168–177.

Farrell, P.Foote, R. Mc Ardle, M. Trouem-Trend, V. and Tardif, A. (1996). Media and dilution procedures tested to minimize handling effects on human, rabbit, and bull sperm for computer-assisted sperm analysis (CASA). Androl Journal, Vol, 17, No, 3. pp: 293-300.

Iguer-Ouada, M. and Verstegan, J. (2001). Evaluation of the Hamilthon- Thorn computer based automated system for dog semen analysis. Theriogenology, Vol, 55, No, 3. pp: 733-749.

Quintero-Moreno, A., Rigau, T., Rodríguez-Gil, J., (2004). Regression analyses and motile sperm subpopulation structure study as improving tools in boar semen quality analysis. Theriogenology, Vol, 61,No, 4. pp: 673–690.

Robayo, I. Montenegro, V. Valde's, C. and Cox, J. (2008). CASA assessment of kinematic parameters of ram spermatozoa and their relationship to migration efficiency in ruminant cervical mucus. Reproduction Domestic Animal Journal, Vol, 43, No, 4. pp:393- 399.

Schafer- Somi S, Aurich CH.(2007). Use of new computer- assisted sperm analyzer for the assessment of motility and viability of dog spermatozoa and evaluation of four different semen extenders for predilution. Animal Reproduction Science, Vol, 102, No, 1-2. pp: 1- 13.

Tardif A.L, Farrel P.B, Trouern- Trend, Footel R.H.(1997). Computer- assisted sperm analysis for assessing initial semen quality and changes during storage at 5˚C. J Dairy Sci, Vol, 80, No, 8. pp: 1606- 1612

Verstegen, J. (2002). Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. Theriogenology, Vol, 57, No, 1. pp: 149-179.

Varner D.D., Vaughan S.D., Johnston L. (1991). Use of a computerized system for evaluation of equine spermatozoa1 motility. Am J Vet Res, Vol, 52, No, 2. pp: 224-228.