نشریه علوم درمانگاهی دامپزشکی ایران؛ ۱۴۰۳؛ ۱۸(۱): ۶۳-۷۳.
http://doi.org/ 10.22034/ijvcs.2024.14828.1094

به‌کارگیری روشی بهینه جهت جداسازی اسپرم‌های کم‌تحرک و پرتحرک در منی تازهٔ تیمار شده با رزیکوئیمود در گاو با هدف جداسازی اسپرم‌های حاوی کروموزوم X از Y

آرش رسولی[۱]، علی کدیور[۲*]، ناصر شمس اسفندآبادی[۲]، نجمه داودیان[۳]، حسن نظری[۳]

۱. دانشجوی دستیاری مامایی و بیماری‌های تولید مثل دام، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد- ایران.
۲. گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد- ایران.
۳. پژوهشکده فناوری جنین دام، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد- ایران.

دریافت: ۱۱ تیرماه ۱۴۰۳ **پذیرش:** ۷ مردادماه ۱۴۰۳

چکیده

هدف از پژوهش حاضر تنظیم و بهینه‌سازی روش جداسازی اسپرم‌های کم‌تحرک و پرتحرک در نمونه‌های اسپرم تازه گاو بود که تحت تیمار با رزیکوئیمود (Resiquimod) قرار گرفته بودند. رزیکوئیمود، آگونیست گیرنده‌های Toll-like 7/8 موجود در اسپرم‌های حاوی کروموزوم X است و سبب کاهش میزان تولید ATP و انرژی در این اسپرم‌ها می‌شود. از این روش جداسازی می‌توان برای جداکردن اسپرم‌های حاوی کروموزوم X و Y در منی تازه گاو استفاده کرد. نمونه‌های منی از پنج گاو نر در سه تکرار جمع‌آوری شد و پس از تیمار با ۰/۳ میکرومول رزیکوئیمود، swim-up در دو ابزار جداسازی A و B (ساخته شده از پلی‌اتیلن و دارای زاویه ۶۰ درجه برای ابزار A و ۸۰ درجه برای ابزار B) بر روی آن‌ها انجام شد. درصد اسپرم‌های متحرک در لایه‌های فوقانی گروه‌ها اختلاف معنادار نداشتند (P>۰/۰۵) ولی در لایه تحتانی، درصد اسپرم‌های متحرک در گروه کنترل بیشتر بود (P<۰/۰۵). نسبت تعداد اسپرم‌های شمارش شده در لایه فوقانی گروه کنترل بیش از دو گروه درمان بود (P<۰/۰۵) و در ابزار B نیز بیش از ابزار A بود (P<۰/۰۵). معادل‌سازی نسبت اسپرم‌های شمارش شده در لایه فوقانی نسبت به مجموع اسپرم‌های شمارش شده در لایه فوقانی و تحتانی نشان داد که تعداد اسپرم‌های موجود در لایه فوقانی ابزار A تقریباً نصف گروه کنترل است. نتیجه‌گیری می‌شود که استفاده از ۰/۳ میکرومول رزیکوئیمود و swim-up در ابزار A می‌تواند به طور مؤثر جهت جداسازی اسپرم‌های متحرک از اسپرم‌های کم‌تحرک با هدف جداسازی اسپرم‌های حاوی کروموزوم X از Y استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: رزیکوئیمود، اسپرم گاو، swim-up، شاخص‌های حرکتی

مقدمه

تعیین هدفمند جنسیت جنین و نتاج در حیوانات اهلی به‌خصوص در سیستم‌های صنعتی دامپروری کاربردهای پژوهشی و اقتصادی متفاوتی دارد. در صنعت پرورش گاو شیری، اسپرم تعیین جنسیت شده ممکن است تولید مازاد گوساله‌های نر را کاهش دهد که به‌عنوان یک محصول جانبی ناخواسته، ارزش اقتصادی پایینی دارند. در صنعت پرورش گاو گوشتی نیاز مبرمی به بهبود عملکرد تولید وجود دارد که می‌تواند با پرورش تلیسه‌های بیشتر از گاوهای باکیفیت بالا انجام شود و در نهایت، دردسترس‌بودن منی تعیین جنسیت شده، امکان انتخاب بهترین گاو نر را فراهم می‌کند.

در پستانداران اسپرمی که توسط جنس نر تولید و با تخمک ترکیب می‌شود، جنسیت جنین را تعیین می‌کند. منی حاوی میلیاردها سلول اسپرم حاوی کروموزوم X یا Yاست؛ اما ازآنجاکه نسبت Y به X برابر یک است، لذا به طور معمول نسبت جنسی یک نر به‌ازای یک ماده در میان نتاج دیده می‌شود. اسپرم‌های تعیین جنسیت شده (sexed semen) در سال‌های اخیر به صنعت گاو شیری معرفی شده است که با کمک روش فلوسیتومتری بادقت

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: kadivar.ali@sku.ac.ir

۸۵٪ تا ۹۵٪ از یکدیگر جداسازی شده و نسبت کروموزوم‌های Y به حداقل می‌رسد. براین‌اساس استفاده از اسپرم تعیین جنسیت شده، سبب افزایش درصد ماده‌زایی می‌شود (۱۴). تاکنون روش‌های متفاوتی برای جداسازی اسپرم‌های X یا Y مورد استفاده قرار گرفته است. این روش‌ها بر اساس تفاوت‌های بالقوه سلول‌های اسپرم از نظر خواص فیزیکی، مقدار DNA ، اندازه، تراکم و تحرک سلول اسپرم هستند. بااین‌وجود تقریباً تمامی این روش‌ها قابلیت کاربرد در ابعاد تجاری ندارند و مقرون‌به‌صرفه نیستند و در حال حاضر، تنها روش کاربردی و تجاری تهیه اسپرم تعیین جنسیت شده، جداسازی فردی اسپرم‌های دارای کروموزوم X و Y با استفاده از فلوسیتومتری است. بااین‌حال، در مقایسه با مایع منی معمولی، این روش هزینه و زمان تولید بالاتری دارد. همچنین، اسپرم ممکن است در طول عمل آسیب ببیند که تحرک و زنده‌ماندن آن‌ها را تحت تأثیر قرار داده و بر پتانسیل لقاح و رشد جنینی تأثیر می‌گذارد. ضمن اینکه در بیشتر موارد تعداد اسپرم‌های آماده شده برای تلقیح کم است (۱, ۹).

در سال‌های اخیر پژوهش‌هایی در مورد استفاده از لیگاند TLR7/8 به‌منظور تفریق اسپرم‌های حاوی کروموزوم X از Y صورت‌گرفته است. گیرنده‌های TLR7/8 ابتدا در نوعی پشه کشف شدند. ابتدا گیرندهٔ شمارهٔ ۱۰ و پس از آن سایر گیرنده‌ها به‌صورت کامل شناسایی شدند. بعدها گیرنده‌های مشابهی در پستانداران به اسم TLRs مورد شناسایی قرار گرفتند. اثبات شده که همهٔ این گیرنده‌ها در فعالیت ایمنی ذاتی دارای نقش هستند. گیرنده‌های تول مانند در انواع مختلفی از سلول‌های ایمنی مانند ماکروفاژها، سلول‌های دندریتیک، NK cells، ماست سل‌ها، مونوسیت‌ها، بازوفیل‌ها، نوتروفیل‌ها، سلول‌های تی و همچنین سلول‌های تنفسی، روده‌ای، اپی‌تلیال و اندوتلیال وجود دارند (۵). تاکنون یازده گیرندهٔ تول مانند در پستانداران شناسایی شده است. این گیرنده‌ها گلیکوپروتئین‌های غشایی هستند که هم در سطح سلول و هم درون‌سلولی بیان می‌شوند. گیرنده‌های تول مانند شمارهٔ ۱، ۲، ۴، ۵، ۶، ۱۰ و ۱۱ در سطح سلول و گیرندهٔ شمارهٔ ۳، ۷، ۸ و ۹ در قسمت اندوزوم/لیزوزوم واقع شده‌اند (۱۲, ۱۳).

اخیراً، یک روش تعیین جنسیت اسپرم بر اساس فعال‌سازی گیرنده‌های تول مانند ۷ و ۸ بر روی سطح اسپرم ایجاد شده است (۸). این گیرنده‌ها به‌صورت موضعی بوده و به ترتیب فقط در ناحیه دم و قطعه میانی اسپرم X شناسایی شده‌اند. در سال ۲۰۲۰، Umehara و همکارانش از رزیکوئیمود که یک لیگاند فعال‌کننده گیرنده‌های تول مانند ۷ و ۸ می‌باشد برای کاهش فعالیت گلیکولیتیک در اسپرم X موش و در نتیجه کاهش تولید ATP در این سلول‌ها استفاده کردند. پس از این با استفاده از تکنیک swim-up اسپرم، موفق به جداسازی اسپرم‌های کم‌تحرک X از اسپرم‌های متحرک Y در گونه موش شدند (۱۶). با استفاده از همین تکنیک در اسپرم منجمد گاو نر، و به‌کارگیری لایه بالایی برای انجام لقاح درون‌آزمایشگاهی، ۲/۸ ± ۹۱/۳ درصد از رویان‌ها XY بودند. اساس استفاده از این روش به این صورت است که داروی رزیکوئیمود (R848) که آگونیست گیرنده‌های تول مانند ۷ و ۸ است، سبب کاهش میزان تولید ATP و انرژی در اسپرم‌های حاوی کروموزوم X می‌گردد. باتوجه‌به اینکه هرچه اسپرم‌ها منبع انرژی بیشتری داشته باشند از تحرک بیشتری برخوردار بوده و پس از swim-up در قسمت بالایی محلول قرار می‌گیرند و باتوجه‌به اینکه این گیرنده‌ها فقط در اسپرم X وجود دارند؛ بنابراین استفاده از رزیکوئیمود سبب کاهش انرژی در اسپرم‌های حاوی کروموزوم X و قرارگیری آن‌ها در قسمت زیرین محلول و قرارگیری اسپرم‌های حاوی کروموزوم Y در قسمت رویی محلول می‌گردد (۱۵). بااین‌حال، این روش نیاز به بهینه‌سازی بیشتری دارد تا در اسپرم تازه انزالی اعمال شود و برای تلقیح مصنوعی استفاده شود. هدف از پژوهش حاضر تنظیم و بهینه‌سازی روش جداسازی اسپرم‌های کم‌تحرک و پرتحرک در نمونه‌های اسپرم تازه گاو بود که تحت تیمار با رزیکوئیمود قرار گرفته بودند. باتوجه‌به تأثیر رزیکوئیمود بر فعال‌سازی گیرنده‌های Toll-like 7/8 موجود بر روی کروموزوم X و کم‌تحرک سازی آن‌ها، از این روش جداسازی می‌توان برای جداکردن اسپرم‌های حاوی کروموزوم X و Y در منی تازه گاو استفاده کرد.

مواد و روش کار

این مطالعه در کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه شهرکرد با شناسه IR.SKU.REC.1400.033 مورد تصویب قرار گرفت.

تمامی مواد مورد استفاده در پژوهش حاضر از شرکت سیگما آلدریچ آلمان خریداری شدند. محیط مورد استفاده در این پژوهش برای نگهداری و جداسازی اسپرم، محیط mHTF بود که جهت ساخت آن مقدار ۱۰۱/۶ میلی‌مول کلرید سدیم، ۴/۶۹ میلی‌مول کلرید پتاسیم، ۰/۲۰ میلی‌مول سولفات منیزیم، ۰/۳۷ میلی‌مولار فسفات پتاسیم، ۲/۰۴ میلی‌مولار کلرید کلسیم، ۲۵ میلی‌مول بی‌کربنات سدیم، ۰/۳۳ میلی‌مول پیرووات، ۲۱/۴ میلی‌مول لاکتات، ۰/۰۷۵ گرم در لیتر پنی‌سیلین و ۰/۰۵ گرم در لیتر استرپتومایسین، ۰/۶ میلی‌مول گلوکز و ۰/۴ درصد آلبومین گاوی در آب مقطر حل شده و اسمولاریته ۵±۲۹۰ تنظیم شد.

در این مطالعه، نمونه‌های اسپرم ۵ گاو نر نژاد هولشتاین در ۳ تکرار مورد استفاده قرار گرفتند. نمونه اسپرم به‌صورت تازه از گاو نر با استفاده از واژن مصنوعی اخذ شد و پس از اضافه کردن محیط mHTF به میزان هم‌حجم، به آزمایشگاه منتقل شدند. اسپرم‌گیری در محل شرکت بهشاد گستر فرزانگان و از گاوهای نر این شرکت انجام شد. نمونه‌های اسپرم تازه در آزمایشگاه تعیین غلظت شده و شاخص‌های حرکتی آن به کمک CASA (Computer-Assisted Semen Analysis) (هوشمند فن‌آور تهران، ایران) مورد ارزیابی قرار گرفت.

سپس ۱۰۰ میلیون سلول اسپرم با استفاده از محیط mHTF به حجم ۱ میلی لیتر رسانده شده و پس از اضافه کردن رزیکوئیمود با غلظت ۰/۳ میکرومول به مدت ۲۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. در گروه کنترل هیچ غلظتی از رزیکوئیمود اضافه نشد. پس از ۲۰ دقیقه انکوباسیون شاخص‌های حرکتی اسپرم در هر دو گروه با استفاده از سیستم CASA مورد ارزیابی قرار گرفت.

به‌منظور انجام Swim up تعداد ۱۰۰ میلیون سلول اسپرم پس از جداسازی از محیط mHTF با کمک سانترفیوژ (۴۰۰ g به مدت ۳ دقیقه) در قسمت پایین ظروف حاوی ۳ میلی‌لیتر محیط کشت mHTF قرار داده شدند. ظروف مورد استفاده برای انجام این آزمایش در ابعاد مشخصی طراحی و ساخته شد. ابزارهای جداسازی مورد استفاده در این تحقیق با استفاده از نرم افزار طراحی صنعتی Solidworks شرکت Dassault Systems فرانسه (https://www.3ds.com) ویرایش ۲۰۱۴ طراحی شدند. در طراحی این ابزارها، سهولت کاربری، عدم سمیت برای سلول‌ها، سهولت دسترسی به مواد اولیه و سهولت ساخت در نظر گرفته شد. مواد اولیه مورد استفاده در ساخت قطعات، پلی‌اتیلن صنعتی با نام تجاری ارتالون و همه قطعات با روش تراشکاری تولید گردید. از نظر ابعاد، طراحی این ابزارها طوری انجام شد که حدود ۵ میلی‌لیتر از محلول هر ابزار را پر کند و به طور کلی ساختار ابزارها به‌صورت یک مخروط وارونه دورن استوانه‌ای از پلی‌اتیلن بود. به دلیل بی سابقه بودن این نوع ساختار در منابع، در طراحی ابزار مهم‌ترین عامل زاویه مخروط در نظر گرفته شد و زوایای ۶۰ درجه برای ابزار A و ۸۰ درجه برای ابزار B در نظر گرفته شدند.

پس از ۲۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، تعداد سلول اسپرم در ۱ میلی‌لیتر از لایه رویی و ۱ میلی‌لیتر لایه زیرین شمارش شده و شاخص‌های حرکتی نیز در این نمونه‌ها مورد ارزیابی قرار گرفتند.

شاخص‌های مربوط به تحرک و پیش‌روندگی اسپرم و همچنین الگوی حرکتی اسپرم در نمونه‌های گروه کنترل و اسپرم‌های تیمار شده با رزیکوئیمود از طریق آزمون تی مستقل آنالیز شدند. همین شاخص‌ها در لایه‌های بالایی و پایینی گروه کنترل و اسپرم‌های تیمار شده با رزیکوئیمود در ابزارهای A و B و همچنین نمونه‌های اسپرم مربوط به ۵ گاو بررسی شده در مطالعه از طریق آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه با یکدیگر مقایسه آماری شدند. آزمون Shapiro-Wilk برای بررسی نرمال بودن داده‌ها مورد استفاده قرار گرفت. نسبت اسپرم‌های جدا شده در لایه فوقانی محیط به اسپرم‌های شمارش شده در لایه تحتانی در گروه‌های کنترل و تیمار و همچنین نسبت اسپرم‌های شمارش شده در لایه فوقانی به مجموع اسپرم‌های شمارش شده در لایه فوقانی و تحتانی، پس از Transform و استفاده از عملکرد Arsin، از طریق آزمون تی مستقل با یکدیگر مقایسه شدند. آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS (version 16; SPSS Inc.,

Chicago, USA) انجام شد. نتایج به‌صورت میانگین±خطای استاندارد نشان داده شدند و اختلاف بین گروه‌ها در سطح P<۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

جداول ۱ و ۲ آنالیز شاخص‌های مرتبط با تحرک و الگوی حرکتی نمونه‌های اسپرم در پنج گاو نر نمونه‌گیری شده برای مطالعه را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود نمونه‌های اسپرم گاوها از نظر تمامی شاخص‌های حرکتی هیچ اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند (میانگین سه تکرار نمونه‌گیری برای هر گاو مورد ارزیابی قرار گرفت).

جدول ۱- میانگین±خطای استاندارد تحرک و پیش‌روندگی اسپرم، مربوط به ۵ گاو بررسی شده در مطالعه، ارزیابی شده با سیستم CASA

شماره گاو	اسپرم متحرک (%)	حرکت پیش‌رونده(%)	پیش‌روندگی اسپرم (%)			
			حرکت پیش‌رونده سریع (class A)	حرکت پیش‌رونده آهسته (class B)	بدون پیش‌روندگی (class C)	غیر متحرک (class D)
۱	۷۹/۸۰±۴/۷۷	۷۳/۴۵±۶/۷۰	۶۸/۱۸±۶/۵۰	۵/۲۷±۰/۶۹	۶/۳۵±۲/۴۱	۲۰/۱۹±۴/۷۷
۲	۷۸/۴۳±۴/۴۴	۷۱/۶۲±۳/۸۰	۶۰/۱۱±۳/۴۵	۱۱/۵۱±۱/۸۷	۶/۸۰±۱/۰۵	۲۱/۵۷±۴/۴۴
۳	۷۸/۷۵±۳/۰۰	۷۲/۸۱±۳/۳۰	۶۴/۸۶±۳/۸۴	۷/۹۴±۱/۳۰	۵/۹۴±۰/۴۸	۲۱/۲۴±۳/۰۰
۴	۷۰/۷۹±۲/۶۰	۶۵/۰۳±۲/۴۳	۵۵/۲۹±۱/۸۵	۹/۷۳±۳/۱۸	۵/۷۶±۱/۰۰	۲۹/۲۰±۲/۶۰
۵	۶۴/۷۴±۷/۲۸	۵۹/۳۸±۷/۵۸	۴۹/۷۷±۱۱/۳۸	۹/۶۰±۳/۸۶	۵/۳۶±۰/۶۰	۳۵/۲۵±۷/۲۸

جدول ۲- میانگین±خطای استاندارد الگوی حرکتی اسپرم، مربوط به ۵ گاو بررسی شده در مطالعه، ، ارزیابی شده با سیستم CASA

شماره گاو	الگوی حرکتی اسپرم								
	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	MAD (°)	ALH (µm)	BCF (Hz)	LIN (%)	WOB (%)	STR (%)
۱	۸۵/۸۳±۵/۷۸	۶۵/۱۵±۶/۳۷	۷۳/۵۷±۶/۵۰	۱۵/۸۳±۲/۷۲	۳/۶۴±۰/۲۲	۴/۷۰±۰/۲۹	۶۳/۲۲±۶/۰۸	۷۶/۰۵±۴/۶۶	۷۳/۶۰±۴/۷۶
۲	۷۷/۸۹±۵/۴۲	۵۴/۲۹±۵/۲۴	۶۳/۸۵±۶/۲۱	۱۵/۸۵±۱/۰۲	۳/۸۳±۰/۱۷	۴/۱۸±۰/۲۷	۵۶/۱۱±۳/۳۲	۷۱/۵۹±۳/۴۸	۶۹/۴۲±۱/۹۰
۳	۸۵/۸۲±۶/۷۶	۶۵/۷۵±۶/۲۸	۷۴/۲۲±۶/۸۹	۱۴/۷۲±۱/۳۴	۳/۶۰±۰/۱۴	۴/۶۷±۰/۴۳	۶۲/۵۹±۲/۷۵	۷۵/۵۸±۲/۴۴	۷۳/۳۵±۲/۰۵
۴	۷۶/۷۱±۷/۶۸	۵۶/۷۴±۶/۶۶	۶۴/۱۴±۷/۰۲	۱۳/۸۴±۲/۰۴	۳/۳۶±۰/۱۱	۳/۸۲±۰/۳۰	۵۶/۲۴±۱/۶۵	۷۰/۰۲±۱/۱۰	۶۹/۸۶±۱/۰۷
۵	۶۸/۶۰±۱۳/۷۶	۵۰/۶۲±۱۲/۹۳	۵۷/۱۰±۱۲/۹۳	۱۱/۶۹±۲/۹۳	۳/۳۶±۰/۱۳	۳/۴۲±۱/۴۸	۵۴/۱۲±۵/۴۷	۶۷/۵۴±۳/۳۲	۶۷/۳۵±۴/۶۸

CASA; Computer-assisted sperm analyzer, VCL; Curvilinear velocity, VSL; Straight-line velocity, VAP; Average path velocity, MAD; Mean angular displacement, ALH; Amplitude of lateral head displacement, BCF; Beat cross frequency, LIN; Linearity, WOB; Wobble, STR; Straightness.

جداول ۳ و ۴ آنالیز شاخص‌های مرتبط با تحرک و الگوی حرکتی نمونه‌های اسپرم گروه کنترل (تیمار نشده با رزیکوئیمود) و نمونه‌هایی که تحت تیمار با رزیکوئیمود قرار گرفتند را نشان می‌دهند.

همان‌طور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود پس از ۲۰ دقیقه انکوباسیون، درصد اسپرم‌های متحرک در گروه تیمار با گروه کنترل اختلاف معنی‌دار داشت (P<۰/۰۵). درصد اسپرم‌های متحرک پیش‌رونده نیز در گروه‌های درمان کمتر از گروه کنترل بود (P<۰/۰۵).

درصد اسپرم‌های متحرک کلاس A در گروه درمان کمتر از گروه کنترل بود و درصد اسپرم‌های کلاس B و D در گروه درمان بیشتر از گروه کنترل بود (P<۰/۰۵). درصد اسپرم‌های کلاس C بین دو گروه اختلاف معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵) (جدول ۳).

نتایج مربوط به شاخص‌های الگوی تحرک اسپرم در جدول ۴ نشان داده شده است. همان‌طور که در جدول مشاهده می‌شود تمامی شاخص‌های الگوی حرکتی در گروه درمان به طور معنادار کمتر از گروه کنترل است (P<۰/۰۵).

جدول ۳- مقایسه میانگین±خطای استاندارد تحرک و پیش‌روندگی اسپرم، مربوط به نمونه‌های اسپرم گروه کنترل و اسپرم‌های تیمار شده با رزیکوئیمود، ارزیابی شده با سیستم CASA

گروه‌ها	اسپرم متحرک (%)	حرکت پیش‌رونده (%)	پیش‌روندگی اسپرم (%)			
			حرکت پیش‌رونده سریع (class A)	حرکت پیش‌رونده آهسته (class B)	بدون‌حرکت‌پیش‌رونده (class C)	غیر متحرک (class D)
کنترل	۷۳/۶۵ ±۲/۳۶[a]	۶۷/۶۱±۲/۴۳[a]	۵۸/۸۳±۲/۷۱[a]	۸/۷۸±۱/۰۰[a]	۶/۰۳±۰/۴۹	۲۶/۳۴±۲/۳۶[a]
رزیکوئیمود	۵۰/۸۱ ±۳/۷۹[b]	۴۳/۸۴±۳/۴۹[b]	۲۷/۸۵±۴/۶۸[b]	۱۵/۹۹±۲/۱۳[b]	۷/۰۱±۱/۱۵	۴۷/۵۹±۳/۹۰[b]

[a,b]حروف غیرمشابه در هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها در سطح ۰/۰۵ می‌باشد.

جدول ۴- مقایسه میانگین±خطای استاندارد الگوی حرکتی اسپرم، مربوط به نمونه‌های اسپرم گروه کنترل و اسپرم‌های تیمار شده با رزیکوئیمود، ارزیابی شده با سیستم CASA

گروه‌ها	الگوی حرکتی اسپرم								
	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	MAD (°)	ALH (µm)	BCF (Hz)	LIN (%)	WOB (%)	STR (%)
کنترل	۷۸/۵۰±۳/۴۱[a]	۵۸/۰۹±۳/۱۹[a]	۶۶/۱۲±۳/۳۹[a]	۱۴/۲۵±۰/۸۶[a]	۳/۵۴±۰/۰۷[a]	۴/۱۱±۰/۲۵[a]	۵۷/۶۹±۱/۹۵[a]	۷۱/۵۶±۱/۵۹[a]	۶۹/۸۹±۱/۶۰[a]
رزیکوئیمود	۴۲/۵۹±۴/۵۴[b]	۲۵/۱۶±۴/۲۱[b]	۳۰/۳۴±۴/۴۷[b]	۷/۳۴±۱/۱۳[b]	۲/۸۲±۰/۱۱[b]	۱/۹۴±۰/۳۰[b]	۳۹/۱۶±۲/۸۱[b]	۵۵/۷۲±۲/۶۴[b]	۵۷/۷۷±۲/۰۹[b]

[a,b]حروف غیرمشابه در هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها در سطح ۰/۰۵ می‌باشد.

CASA; Computer-assisted sperm analyzer, VCL; Curvilinear velocity, VSL; Straight-line velocity, VAP; Average path velocity, MAD; Mean angular displacement, ALH; Amplitude of lateral head displacement, BCF; Beat cross frequency, LIN; Linearity, WOB; Wobble, STR; Straightness.

نتایج مربوط به آنالیز پارامترهای حرکتی و الگوی حرکتی اسپرم پس از swim-up در جداول ۵ و ۶ نشان داده شده است. همان‌طور که در جدول ۵ مشاهده می‌شود، در تمامی گروه‌ها اختلاف معناداری میان درصد اسپرم متحرک لایه فوقانی با لایه تحتانی همان گروه دیده نمی‌شود (P>۰/۰۵). بین درصد اسپرم متحرک در لایه‌های فوقانی هر سه گروه اختلاف معنادار دیده نمی‌شود (P>۰/۰۵). در لایه تحتانی گروه کنترل درصد اسپرم متحرک به‌صورت معنادار بیش از دو گروه A و B است (P<۰/۰۵).

مقایسه درصد اسپرم‌های متحرک پیش‌رونده میان‌لایه‌های فوقانی گروه‌های کنترل، A و B نشان می‌دهد که تحرک پیش‌رونده لایه فوقانی گروه کنترل به طور معنی‌دار بیش از تحرک پیش‌رونده لایه فوقانی گروه A است، درحالی‌که با لایه فوقانی گروه B تفاوت معنی‌داری ندارد. درصد اسپرم‌های متحرک پیش‌رونده در لایه تحتانی گروه کنترل به طور معنی‌دار بیش از تحرک پیش‌رونده در لایه تحتانی گروه A و B است (P<۰/۰۵). تحرک پیش‌رونده در لایه تحتانی گروه کنترل به‌طور معنادار بیش از تحرک پیش‌رونده در لایه تحتانی گروه‌های A و B است (P<۰/۰۵). تحرک پیش‌رونده میان لایه‌های فوقانی و تحتانی گروه‌های کنترل و B در همان گروه اختلاف معنی‌داری نداشتند (P>۰/۰۵)، ولی تحرک

پیش‌رونده در لایه‌های فوقانی گروه A به طور معنی‌دار بیش از لایه و تحتانی این گروه بود (P<۰/۰۵).

مقایسه درصد کلاس A حرکت نشان داد که لایه فوقانی با تحتانی گروه کنترل اختلاف معنی‌دار نداشت؛ ولی لایه فوقانی و تحتانی گروه‌های A و B با هم اختلاف معنی‌دار داشتند (p<۰/۰۵). از این نظر، لایه فوقانی گروه کنترل با لایه فوقانی گروه‌های A و B اختلاف معنی‌دار داشت (p<۰/۰۵) و لایه تحتانی گروه کنترل نیز با لایه تحتانی گروه‌های A و B اختلاف معنی‌دار داشت (P<۰/۰۵).

درصد کلاس B حرکت در لایه فوقانی گروه کنترل به طور معنی‌دار کمتر از گروه A است (P<۰/۰۵) ولی با گروه B اختلاف معنی‌دار نداشت (P>۰/۰۵). از این نظر، اختلاف معنی‌داری میان لایه‌های تحتانی گروه‌های کنترل، A و B وجود نداشت. لایه‌های فوقانی با تحتانی گروه‌های کنترل، A و B اختلاف معنی‌دار نداشتند (P>۰/۰۵).

در کلاس C حرکت اختلاف معنی‌داری میان لایه‌های فوقانی گروه‌های کنترل، A و B وجود نداشت (P>۰/۰۵). اختلاف معنی‌داری میان لایه‌های تحتانی گروه‌های کنترل، Aو B وجود نداشت (P>۰/۰۵). لایه‌های فوقانی با تحتانی گروه‌های کنترل، A و B نیز در همان گروه با یکدیگر اختلاف معنی‌دار نداشتند (P>۰/۰۵).

درصد کلاس D حرکت در لایه تحتانی گروه کنترل به طور معنادار کمتر از لایه تحتانی دو گروه تیمار بود (P<۰/۰۵) و اختلاف معنی‌دار دیگری میان لایه‌های فوقانی گروه‌ها مشاهده نشد (P>۰/۰۵).

نتایج مربوط به شاخص‌های الگوی تحرک اسپرم پس از swim-up در جدول ۶ نشان داده شده است. در شاخص VCL لایه فوقانی گروه کنترل با لایه فوقانی گروه‌های A و B اختلاف معنی‌دار داشت (P<۰/۰۵) و لایه تحتانی گروه کنترل با لایه تحتانی گروه‌های Aو B اختلاف معنی‌دار داشت (P<۰/۰۵).

در شاخص VSL لایه فوقانی و تحتانی گروه A با هم اختلاف معنی‌دار داشتند (P<۰/۰۵). لایه فوقانی گروه کنترل با لایه فوقانی گروه‌های A و B اختلاف معنی‌دار داشت (P<۰/۰۵). لایه تحتانی گروه A با لایه تحتانی گروه B اختلاف معنی‌دار نداشت (P>۰/۰۵). لایه تحتانی گروه کنترل با لایه تحتانی گروه‌های A و B اختلاف معنی‌دار داشت (P<۰/۰۵).

در شاخص VAP لایه فوقانی و تحتانی گروه A با هم اختلاف معنی‌دار داشت (P<۰/۰۵). لایه فوقانی گروه کنترل با لایه فوقانی گروه‌های A و B اختلاف معنی‌دار داشت (P<۰/۰۵). لایه تحتانی گروه کنترل با لایه تحتانی گروه‌های A و B اختلاف معنی‌دار داشت (P<۰/۰۵).

در شاخص MAD لایه فوقانی گروه کنترل با لایه فوقانی گروه‌های A و B اختلاف معنی‌دار داشت (P<۰/۰۵). لایه تحتانی گروه کنترل با لایه تحتانی گروه‌های A و B اختلاف معنی‌دار داشت (P<۰/۰۵).

در شاخص ALH لایه فوقانی گروه کنترل با لایه فوقانی گروه‌های A و B اختلاف معنی‌دار داشت (P<۰/۰۵). لایه تحتانی گروه کنترل با لایه تحتانی گروه‌های A و B اختلاف معنی‌دار داشت (P<۰/۰۵).

در شاخص BCF لایه فوقانی گروه کنترل با لایه فوقانی گروه‌های A و B اختلاف معنی‌دار داشت (P<۰/۰۵). لایه تحتانی گروه کنترل با لایه تحتانی گروه‌های A و B اختلاف معنی‌دار داشت (P<۰/۰۵).

در شاخص LIN لایه فوقانی گروه کنترل با لایه فوقانی گروه‌های A و B اختلاف معنی‌دار داشت. لایه تحتانی گروه کنترل با لایه تحتانی گروه‌های A و B اختلاف معنی‌دار داشت (P<۰/۰۵). لایه فوقانی گروه A با لایه تحتانی گروه A اختلاف معنی‌دار داشت (P<۰/۰۵).

در شاخص WOB لایه فوقانی گروه کنترل با لایه فوقانی گروه A اختلاف معنی‌دار داشت (P<۰/۰۵). لایه تحتانی گروه کنترل با لایه تحتانی گروه‌های A و B اختلاف معنی‌دار داشت (P<۰/۰۵).

در شاخص STR لایه فوقانی گروه کنترل با لایه فوقانی گروه A اختلاف معنی‌دار داشت (P<۰/۰۵). لایه تحتانی گروه کنترل با لایه تحتانی گروه‌های A و B اختلاف معنی‌دار داشت (P<۰/۰۵).

جدول ۵- مقایسه میانگین±خطای استاندارد تحرک و پیش‌روندگی اسپرم لایه‌های بالایی و پایینی گروه کنترل و اسپرم‌های تیمار شده با رزیکوئیمود در ابزارهای A و B، ارزیابی شده با سیستم CASA

ردیف	گروه‌ها	اسپرم متحرک(%)	حرکت پیش‌رونده (%)	پیش‌روندگی اسپرم (%)			
				حرکت پیش‌رونده سریع (class A)	حرکت پیش‌رونده آهسته (class B)	بدون حرکت پیش‌رونده (class C)	غیر متحرک (class D)
۱	لایه بالایی گروه کنترل	۶۵/۰۶±۲/۲۲ (۵, ۶)	۵۸/۳۱±۲/۲۳ (۲, ۵, ۶)	۴۹/۰۰±۲/۳۵ (۲, ۳, ۵, ۶)	۹/۳۰±۱/۰۹ (۲, ۵, ۶)	۶/۷۵±۰/۳۹ (۴)	۳۴/۹۳±۲/۲۲ (۵, ۶)
۲	لایه بالایی ابزار A	۵۶/۴۳±۴/۱۱	۴۹/۳۱±۴/۰۷ (۱, ۵)	۳۴/۳۷±۳/۹۲ (۱, ۴, ۵)	۱۴/۹۳±۱/۷۰ (۱)	۷/۱۲±۰/۴۲ (۴)	۴۳/۵۶±۴/۱۱
۳	لایه بالایی ابزار B	۵۹/۰۰±۳/۴۱ (۵)	۵۱/۰۳±۳/۴۳ (۵)	۳۷/۰۴±۳/۳۸ (۱, ۵, ۶)	۱۳/۹۸±۱/۸۵	۷/۹۷±۰/۵۶	۴۰/۹۹±۳/۴۱ (۵)
۴	لایه پایینی گروه کنترل	۶۲/۴۴±۲/۶۰ (۵, ۶)	۵۳/۷۵±۲/۵۲ (۵, ۶)	۴۳/۳۸±۲/۲۴ (۲, ۵, ۶)	۱۰/۳۶±۱/۰۸	۸/۶۹±۰/۴۹ (۱, ۲)	۳۷/۵۵±۲/۶۰ (۵, ۶)
۵	لایه پایینی ابزار A	۴۶/۳۷±۴/۸۷ (۱, ۳, ۴)	۳۸/۶۰±۴/۷۲ (۱, ۲, ۳, ۴)	۲۳/۱۴±۳/۶۸ (۱, ۲, ۳, ۴)	۱۵/۴۶±۲/۶۱ (۱)	۷/۷۷±۰/۹۷	۵۳/۶۲±۴/۸۷ (۱, ۳, ۴)
۶	لایه پایینی ابزار B	۴۹/۴۸±۴/۴۰ (۱, ۴)	۴۱/۴۹±۴/۳۱ (۱, ۴)	۲۶/۴۰±۲/۶۹ (۱, ۳, ۴)	۱۵/۰۸±۳/۰۱ (۱)	۷/۹۹±۰/۵۸	۵۰/۵۱±۴/۴۰ (۱, ۴)

اعداد موجود در پرانتزها شماره ردیف گروه‌هایی هستند که گروه مرجع با آن‌ها دارای اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.

جدول ۶- مقایسه میانگین±خطای استاندارد الگوی حرکتی اسپرم لایه‌های بالایی و پایینی گروه کنترل و اسپرم‌های تیمار شده با رزیکوئیمود در ابزارهای A و B، ارزیابی شده با سیستم CASA

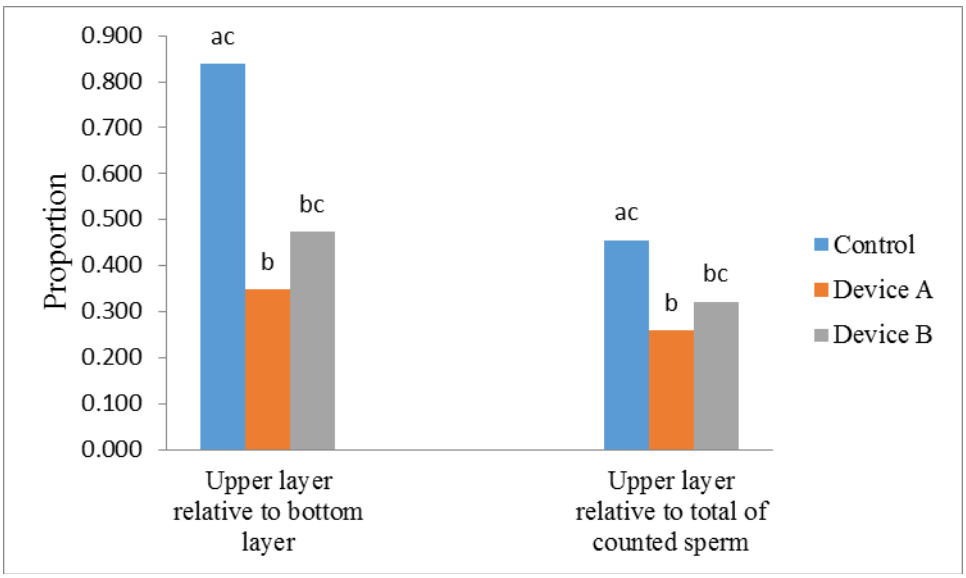
ردیف	گروه‌ها	الگوی حرکتی اسپرم								
		VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	MAD (°)	ALH (µm)	BCF (Hz)	LIN (%)	WOB (%)	STR (%)
۱	لایه بالایی گروه کنترل	۶۹/۹۲±۳/۳۰ (۲, ۳, ۵, ۶)	۴۷/۱۰±۳/۴۹ (۲, ۳, ۵, ۶)	۵۳/۷۳±۳/۶۷ (۲, ۳, ۵, ۶)	۱۸/۴۴±۰/۹۸ (۲, ۳, ۵, ۶)	۳/۴۷±۰/۰۷ (۲, ۳, ۵, ۶)	۳/۸۹±۰/۱۸ (۲, ۳, ۵, ۶)	۴۷/۰۹±۲/۰۴ (۲, ۳, ۵, ۶)	۶۱/۱۳±۱/۸۸ (۲, ۵, ۶)	۶۳/۱۲±۱/۴۷ (۲, ۵, ۶)
۲	لایه بالایی ابزار A	۴۸/۷۹±۴/۵۱ (۱, ۴)	۲۸/۹۰±۴/۳۴ (۱, ۴, ۵)	۳۴/۵۹±۴/۴۹ (۱, ۴, ۵)	۱۰/۹۵±۱/۱۲ (۱, ۴)	۳/۰۱±۰/۱۳ (۱, ۴)	۲/۳۳±۰/۲۹ (۱, ۴)	۳۸/۸۰±۳/۰۸ (۱, ۵)	۵۴/۷۶±۲/۷۰ (۱)	۵۶/۶۵±۲/۵۹ (۱)
۳	لایه بالایی ابزار B	۴۹/۳۲±۳/۰۰ (۱, ۴)	۲۸/۳۷±۳/۲۰ (۱, ۴)	۳۴/۰۴±۳/۲۴ (۱, ۴)	۱۲/۱۸±۱/۰۳ (۱, ۴)	۳/۰۶±۰/۰۸ (۱, ۴)	۲/۳۱±۰/۲۸ (۱, ۴)	۴۰/۰۶±۲/۴۱ (۱, ۵)	۵۵/۷۶±۲/۰۱ (۵)	۵۸/۷۳±۱/۹۹
۴	لایه پایینی گروه کنترل	۶۴/۱۰±۲/۶۸ (۲, ۳, ۵, ۶)	۳۹/۰۷±۲/۳۶ (۲, ۳, ۵, ۶)	۴۶/۰۷±۲/۶۹ (۲, ۳, ۵, ۶)	۱۸/۲۱±۱/۲۶ (۲, ۳, ۵, ۶)	۳/۵۳±۰/۰۹ (۲, ۳, ۵, ۶)	۳/۴۶±۰/۲۰ (۲, ۳, ۵, ۶)	۴۲/۵۰±۱/۴۸ (۵, ۶)	۵۷/۹۱±۱/۴۳ (۵, ۶)	۶۰/۴۷±۱/۳۳ (۵, ۶)
۵	لایه پایینی ابزار A	۳۹/۰۳±۳/۵۰ (۱, ۴)	۱۸/۰۷±۲/۸۲ (۱, ۲, ۴)	۲۳/۴۷±۳/۰۳ (۱, ۲, ۴)	۹/۵۵±۱/۳۹ (۱, ۴)	۲/۹۱±۰/۱۳ (۱, ۴)	۱/۶۸±۰/۳۰ (۱, ۴)	۳۱/۲۶±۲/۷۹ (۱, ۲, ۳, ۴)	۴۸/۸۹±۲/۳۸ (۱, ۳, ۴)	۵۲/۴۵±۲/۷۴ (۱, ۴)
۶	لایه پایینی ابزار B	۴۰/۰۲±۲/۳۸ (۱, ۴)	۱۹/۸۹±۲/۱۵ (۱, ۴)	۲۵/۳۲±۲/۲۵ (۱, ۴)	۹/۶۴±۰/۹۸ (۱, ۴)	۲/۸۷±۰/۰۷ (۱, ۴)	۱/۷۲±۰/۲۳ (۱, ۴)	۳۳/۷۴±۲/۳۸ (۱, ۴)	۵۱/۰۰±۲/۱۷ (۱, ۴)	۵۳/۴۵±۲/۴۷ (۱, ۴)

اعداد موجود در پرانتزها شماره ردیف گروه‌هایی هستند که گروه مرجع با آن‌ها دارای اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.

CASA; Computer-assisted sperm analyzer, VCL; Curvilinear velocity, VSL; Straight-line velocity, VAP; Average path velocity, MAD; Mean angular displacement, ALH; Amplitude of lateral head displacement, BCF; Beat cross frequency, LIN; Linearity, WOB; Wobble, STR; Straightness.

به‌منظور بررسی عملکرد روش جداسازی در پژوهش حاضر، نسبت اسپرم‌های جدا شده در ۱ میلی‌لیتر از لایه فوقانی محیط به اسپرم‌های شمارش شده در لایه تحتانی در گروه‌های کنترل و تیمار مورد مقایسه قرار گرفتند. نتایج حاصل در شکل ۱ نشان داده شده است. همان‌طور که در این شکل مشاهده می‌شود، نسبت تعداد اسپرم‌های شمارش شده در لایه فوقانی نسبت به لایه تحتانی ابزارهای حاوی اسپرم تیمار شده با رزیکوئیمود و همچنین گروه کنترل محاسبه و با یکدیگر مقایسه شده است. این نسبت در گروه کنترل به طور معنی‌دار از هر دو ابزار

استفاده شده بیشتر بود و همچنین این نسبت در ابزار B به طور معنی‌دار بیش از ابزار A است. در همین شکل نسبت اسپرم‌های شمارش شده در لایه فوقانی به مجموع اسپرم‌های شمارش شده در لایه فوقانی و تحتانی نیز محاسبه و مورد مقایسه قرار گرفته است. این نسبت در گروه کنترل به طور معنی‌دار از هردو ابزار بیشتر بوده و در ابزار B به طور معنی‌دار بیش از ابزار A بود. در این مرحله و باتوجه‌به اینکه هدف از پژوهش حاضر جداسازی اسپرم‌های کم‌تحرک و پرتحرک در نمونه‌های اسپرم تازه گاو به‌منظور استفاده نهایی در جداسازی اسپرم‌های حاوی کروموزوم X از Y بود، لذا روش ایده‌آل روشی است که تعداد سلول‌های swim شده را به حدود ۵۰٪ گروه کنترل برساند. برای بررسی این موضوع، برای نسبت اسپرم‌های شمارش شده در لایه فوقانی به مجموع اسپرم‌های شمارش شده در لایه فوقانی و تحتانی در گروه‌های کنترل، ابزار A و ابزار B مخرج مشترک گرفته شد. بر این اساس، تعداد اسپرم‌های شمارش شده در لایه فوقانی ابزار Aو B به ترتیب، ۰/۵۷ و ۰/۷۱ تعداد اسپرم‌های شمارش شده در لایه فوقانی گروه کنترل بود. بنابراین با هدف جداسازی اسپرم‌ها به‌منظور استفاده نهایی در جداسازی اسپرم‌های حاوی کروموزوم X از Y، ابزار A بهتر از ابزار B بود.



شکل ۱- نسبت اسپرم‌های جدا شده در لایه فوقانی محیط به اسپرم‌های شمارش شده در لایه تحتانی در گروه‌های کنترل و تیمار و همچنین نسبت اسپرم‌های شمارش شده در لایه فوقانی به مجموع اسپرم‌های شمارش شده در لایه‌های فوقانی و تحتانی

بحث

تقاضای فزاینده‌ای برای محصولات لبنی و گوشت گاو در سراسر جهان وجود دارد که نیاز به تمرکز زیادی بر بهبود کارایی تولید دارد. استفاده از منی تعیین جنسیت شده در تولید گاوهای شیری و گوشتی فواید متعددی در سطح مزرعه و صنعت دارد. به طور خاص، استفاده از این فناوری می‌تواند کارایی تولید لبنیات و گوشت گاو را افزایش دهد، سوددهی مزرعه را افزایش دهد و پایداری زیست‌محیطی کشاورزی گاو را بهبود بخشد. انتخاب جنسیت در زمان لقاح یا قبل از لقاح، همواره یکی از مهم‌ترین چالش‌های پیش روی بشر بوده است و همراه با استراتژی‌های مختلف تولیدمثل، راه‌های مختلفی برای متعادل‌کردن نسبت‌های جنسی در قلمرو حیوانات تکامل یافته است. اولین روش‌های مورد استفاده برای جداسازی اسپرم‌های X یا Y بر اساس تفاوت‌های بالقوه آن‌ها در خواص فیزیکی، از جمله مقدار DNA، اندازه، تراکم و تحرک سلول اسپرم بود (۱۵). اخیراً روشی بر اساس فعال‌سازی گیرنده‌های تول مانند ۷ و ۸ که فقط بر روی اسپرم X یافت می‌شوند گزارش شده است. گیرنده تول شماره ۷ در دم اسپرم و گیرنده تول شماره ۸ در قسمت

میانی اسپرم بیان می‌شود که هر دو به‌عنوان محل‌هایی برای تولید ATP هستند. براین‌اساس پیش‌بینی شده است که از آگونیست‌های این گیرنده‌ها (مانند داروی رزیکوئیمود) می‌توان جهت جداسازی اسپرم‌های حاوی کروموزوم X از کروموزوم Y استفاده کرد (۲).

در مطالعه حاضر برای جداسازی اسپرم‌های X و Y از رزیکوئیمود، فعال‌کننده گیرنده‌های تول مانند ۷ و ۸ استفاده شد تا با مهار مسیر گلیکولیز و در نتیجه کاهش ATP موردنیاز برای تحرک اسپرم باعث کاهش قابلیت حرکت اسپرم شود. ازآنجاکه این گیرنده‌ها تنها در اسپرم‌های X شناسایی شده‌اند؛ لذا فقدان انرژی و در نتیجه کاهش تحرک در این دسته از اسپرم‌ها اتفاق افتاده و در فرایند swim-up عمدتاً اسپرم‌های Y قادر به حرکت به سمت فوقانی محیط هستند. هدف از پژوهش حاضر تنظیم شرایط swim-up برای استفاده از این تکنیک بر روی اسپرم تازه گاو بود تا بتوان تعداد هرچه بیشتری از اسپرم‌های Y را از اسپرم‌های X جدا کرده تا شانس آبستنی ماده با تلقیح این اسپرم‌ها افزایش پیدا کند، به همین منظور تحرک و پارامترهای مرتبط با آن به‌عنوان معیار ارزیابی مقایسه‌ای مورد استفاده قرار گرفتند.

تحرک اسپرم معمول‌ترین فاکتوری است که با باروری اسپرم و توانایی لقاح آن ارتباط زیادی دارد و پارامتر انتخابی برای ارزیابی آسیب‌های وارد به اسپرم در زمان دست‌کاری‌هایی از جمله انجماد است (۶). ارزیابی اسپرم با استفاده از میکروسکوپ نوری تا حدودی ذهنی و وابسته به فرد اپراتور بوده و لذا صحت بالایی ندارد (۳) ولی ارزیابی عینی و دقیق آن با استفاده از روش CASA که خصوصیات متعددی از تحرک اسپرم را بررسی می‌کند ازجمله حرکت پیش‌رونده، سرعت شتاب و الگوی حرکت اطلاعات بسیار دقیق و صحیحی از جنبه‌های مختلف تحرک اسپرم فراهم می‌کند (۴).

معیار تحرک نشان‌دهنده نسبت اسپرم‌های متحرک به تعداد کل سلول‌های اسپرم است که به‌صورت درصد بیان می‌شود. در مطالعه حاضر پس از انکوباسیون اسپرم با رزیکوئیمود، تمامی شاخص‌های حرکتی اسپرم کاهش معناداری را نسبت به گروه کنترل نشان دادند که به دلیل تأثیر این تیمار بر روی اسپرم است. در مطالعه Umehara و همکاران در سال ۲۰۲۰ نیز کاهش معنادار تحرک اسپرم پس از تیمار با رزیکوئیمود با مکانیسم کاهش میزانATP در سلول‌های اسپرم X و در نتیجه کاهش تحرک نیمی از جمعیت اسپرم نشان داده شد.

تیمار رزیکوئیمود موجب افت سایر پارامترهای حرکتی اسپرم نیز شد از جمله حرکت پیش‌رونده، درصد اسپرم‌های کلاس A و شاخص‌های مرتبط با سرعت و الگوی حرکت درحالی‌که درصد اسپرم‌های کلاس B و D در گروه درمان بیش از کنترل بوده و در کلاس C تفاوت معناداری مشاهده نشد؛ لذا نتایج نشان می‌دهد که تیمار رزیکوئیمود به‌صورت معنادار تحرک اسپرم را کاهش داده است.

پس از swim-up و مقایسه شاخص‌های حرکتی لایه‌های فوقانی و تحتانی، نتایج نشان داد که درصد تحرک اسپرم در لایه‌های فوقانی گروه کنترل با گروه‌های تیمار تفاوت معناداری نداشت. این عدم اختلاف در درصد اسپرم‌های متحرک لایه فوقانی سه گروه نشان می‌دهد که حتی زمانی که تیمار رزیکوئیمود به اسپرم اضافه شده باشد باز هم درصد بالایی از اسپرم‌های متحرک به لایه فوقانی می‌روند. وجود درصد بالاتری اسپرم متحرک در لایه پایینی گروه کنترل نسبت به تیمارها نشان‌دهنده تأثیر رزیکوئیمود بر کاهش تحرک اسپرم است.

حرکت پیش‌رونده درصد تعداد سلول‌هایی است که با سرعت بیش‌تر از متوسط شتاب حرکت کرده و STR بالاتر از آستانه استاندارد دارند (۷). در این آزمایش، حرکت پیش‌رونده در لایه فوقانی گروه کنترل بیشتر از گروه A بود ولی با گروه B تفاوت معناداری نداشت این در حالی است که مقایسه لایه‌های زیرین نشان‌دهنده حرکت پیش‌رونده بیشتر در گروه کنترل در مقایسه با گروه‌های A و B بود و نشان می‌دهد که در گروه B تعداد بیشتری از سلول‌های اسپرم به سمت لایه فوقانی حرکت کرده‌اند و در بخش تحتانی هم بیشتر سلول‌ها دارای تحرک پایین هستند. عدم وجود اختلاف معنی‌دار میان درصد اسپرم‌های متحرک پیش‌رونده در لایه فوقانی کنترل با لایه فوقانی گروه B نشان می‌دهد که ابزار B در جداسازی اسپرم بهتر از ابزار A عمل کرده است و برای جداسازی مؤثر قابل استفاده می‌باشد.

VSL شتاب جابه‌جایی سلول در یک مسیر مستقیم و VCL همین شتاب در یک مسیر منحنی را در بازه

زمانی نشان می‌دهند. VAP کل فاصله در طول متوسط یک مسیر صاف نسبت به زمان صرف شده را نشان می‌دهد. در حالت معمول VCL بالاترین مقدار و VSL کمترین مقدار را دارد و VAP تقریباً با VSL برابر است درحالی‌که وقتی حرکت اسپرم خطی نباشد و حرکت جانبی و انحرافی سر زیاد باشد مقدار VAP بیشتر از VSL خواهد بود (۱۰). Straightness انحراف از مسیر خطی را نشان می‌دهد و نسبت VSL به VAP است. Linearity جدا شدن مسیر سلول از خط صاف را نشان می‌دهد و نسبت VSL به VCL است. ALH متوسط عرض نوسانات سر اسپرم در طی حرکت شنامانند نشان می‌دهد. BCF اندازه‌گیری فرکانسی است که با آن فرکانس اسپرم از مسیر در هرجهتی عبور می‌کند. این فاکتور بری ارزیابی الگوی حرکتی دم اسپرم مفید است (۱۱). مقایسه این پارامترهای حرکتی نشان می‌دهد که در هر گروه تفاوت معناداری میان اسپرم‌های لایه فوقانی با تحتانی وجود دارد. از طرف دیگراختلاف معناداری در این شاخص‌ها میان گروه کنترل با درمان‌ها دیده می‌شود. این پارامترهای الگوی تحرک اسپرم عمدتاً نشان‌دهنده سرعت حرکت اسپرم است و بالاتر بودن این شاخص‌ها در گروه کنترل به دلیل تأثیر رزیکوئیمود در کاهش تحرک تقریباً نیمی از جمعیت اسپرم است.

از طرف دیگر درصد اسپرم‌های متحرک در لایه‌های فوقانی گروه‌های A و B بیش از لایه تحتانی است و در مقایسه با اختلاف میان لایه‌های فوقانی و تحتانی کنترل، در دو گروه درمان اختلاف بیشتری مشاهده می‌شود. درصد اسپرم‌های متحرک در لایه فوقانی گروه A بیشتر از دو گروه دیگر است و درصد تحرک پیش‌رونده هم در گروه B بیش از گروه A است. درصد اسپرم‌های کلاس آ و همچنین شاخص‌های LIN و STR در گروه B بیش از گروه A است.

مقایسه شمارش تعداد اسپرم‌های جدا شده در بخش‌های فوقانی و تحتانی پس از swim-up نشان می‌دهد که تعداد اسپرم‌های جداشده در گروه کنترل بیش از گروه‌های درمان است که یک نتیجه قابل‌انتظار می‌باشد؛ زیرا در گروه‌های درمانی تعداد کمتری اسپرم قابلیت تحرک دارند. این در حالی‌ست که در میان دو گروه درمان، در گروه B تعداد اسپرم‌های جداشده بیشتر است که نشان‌دهنده عملکرد بهتر این ابزار در جداسازی اسپرم با روش swim-up می‌باشد.

نتیجه‌گیری می‌شود که برای جداسازی اسپرم‌های تازه گاو که تحت تیمار رزیکوئیمود قرار گرفته‌اند، استفاده از ۰/۳ میکرومول رزیکوئیمود و swim-up در هر دو ابزار A و B می‌تواند به طور مؤثر تعداد قابل توجهی اسپرم متحرک را از اسپرم‌های کم‌تحرک شده جدا کند، ولی با هدف جداسازی اسپرم‌های کم‌تحرک و پرتحرک در نمونه‌های اسپرم تازه گاو به‌منظور استفاده نهایی در جداسازی اسپرم‌های حاوی کروموزوم X از Y ، ابزار A بهتر از ابزار B بود. زیرا تعداد سلول‌های swim شده را به ٪۵۷ گروه کنترل رساند.

قدردانی و تشکر

بدین‌وسیله از همکاری معاونت پژوهشی دانشگاه شهرکرد و شرکت بهشاد گستر فرزانگان که در اجرای این تحقیق یاری‌گر بودند تقدیر و تشکر می‌گردد.

منابع

1. DeJarnette J, Nebel R, Marshall C, Moreno J, McCleary C, Lenz R. Effect of sex-sorted sperm dosage on conception rates in Holstein heifers and lactating cows. Journal of dairy science. 2008;91(5):1778-85.
2. Han TL, Flaherty SP, Ford JH, Matthews CD. Detection of X-and Y-bearing human spermatozoa after motile sperm isolation by swim-up. Fertility and sterility. 1993;60(6):1046-51.
3. Holroyd R, Doogan V, De Faveri J, Fordyce G, McGowan M, Bertram J, et al. Bull selection and use in northern Australia: 4. Calf output and predictors of fertility of bulls in multiple-sire herds. Animal Reproduction Science. 2002;71(1-2):67-79.
4. Holt W, Palomo M. Optimization of a continuous real-time computerized semen analysis system for ram sperm motility assessment, and evaluation of four methods of semen preparation. Reproduction, fertility and development. 1996;8(2):219-30.
5. Kanzler H, Barrat FJ, Hessel EM, Coffman RL. Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. Nature medicine. 2007;13(5):552-9.

smoothing- independent kinematic values of capacitating human spermatozoa. Human Reproduction. 1999;14(4):997-1004.
12. Pandey S, Agrawal DK. Immunobiology of Toll-like receptors: emerging trends. Immunology and Cell Biology. 2006;84(4):333-41.
13. Rezaei N. Therapeutic targeting of pattern-recognition receptors. International immunopharmacology. 2006;6(6):863-9.
14. Seidel G. Update on sexed semen technology in cattle. Animal. 2014;8(s1):160-4.
15. Umehara T, Tsujita N, Shimada M. Activation of Toll-like receptor 7/8 encoded by the X chromosome alters sperm motility and provides a novel simple technology for sexing sperm. PLoS biology. 2019;17(8):e3000398.
16. Umehara T, Tsujita N, Zhu Z, Ikedo M, Shimada M. A simple sperm-sexing method that activates TLR7/8 on X sperm for the efficient production of sexed mouse or cattle embryos. Nature Protocols. 2020:1-23.
6. Kathiravan P, Kalatharan J, John Edwin M, Veerapandian C. Post-thaw sperm motion characteristics of different crossbred bull spermatozoa assessed by computer assisted semen analyzer. J Remount Vet Corps. 2005; 44:33-8.
7. Kathiravan P, Kalatharan J, Karthikeya G, Rengarajan K, Kadirvel G. Objective sperm motion analysis to assess dairy bull fertility using computer-aided system–a review. Reproduction in Domestic Animals. 2011;46(1):165-72.
8. Katigbak RD, Turchini GM, de Graaf SP, Kong L, Dumée LF. Review on sperm sorting technologies and sperm properties toward new separation methods via the interface of biochemistry and material science. Advanced Biosystems. 2019;3(9):1900079.
9. Moore S, Hasler J. A 100-Year Review: Reproductive technologies in dairy science. Journal of dairy science. 2017;100(12):10314-31.
10. Mortimer ST. CASA—practical aspects. Journal of andrology. 2000;21(4):515-24.
11. Mortimer ST, Swan MA. Effect of image sampling frequency on established and

Vol. 18 - No. 1
Spring & Summer 2024

Iran. J. Vet. Clin. Sci.; 2024; 18(1):63-73.
http://doi.org/ 10.22034/ijvcs.2024.14828.1094

Using an optimal method to separate low-motile and high-motile sperms in fresh bull semen treated with Resiquimod with the aim of separating sperms containing X from Y chromosomes

Arash Rasouli[1], Ali Kadivar[2*], Naser Shams Esfandabadi[2], Najmeh Davoodian[3], Hassan Nazari[3]

1. DVSc Student of Theriogenology, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord- Iran.
2. Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord- Iran.
3. Research Institute of Animal Embryo Technology, Shahrekord University, Shahrekord- Iran.

Received: 1 July 2024 ***Accepted:*** 28 July 2024

Summary

This study aimed to adjust and optimize the method of separating low-motile and high-motile sperms in fresh bovine semen treated with resiquimod, an agonist of Toll-like 7/8 receptors present in X-chromosome-containing sperms and causes a decrease in ATP and energy production. This method could separate X and Y sperms in fresh cow semen. Semen samples were obtained from five bulls in three replications, treated with 0.3 µM resiquimod, and subjected to swim up in two separation tools A and B (made of polyethylene and has an angle of 60 degrees for tool A and 80 degrees for tool B). There was no significant difference in the percentage of motile sperm in the upper layers of the groups ($P>0.05$); however, the percentage of motile sperm was higher in the lower layer of the control group ($P<0.05$). The ratio of the number of counted sperm in the upper layer of the control group was significantly more than the two treated groups ($P<0.05$) and was higher in tool B than in tool A ($P<0.05$). Equating the ratio of sperms counted in the upper layer to the total number of sperms counted in the upper and lower layers showed that the number of sperms in the upper layer of tool A is almost half of the control group. It is concluded that the use of 0.3 micromol of resiquimod and swim-up in instrument A can be effectively used to separate motile sperm from immobile sperm to separate sperm containing X chromosome from Y.

Keywords: Resiquimode, Bovine Sperm, Swim-Up, Motion Parameters

***Corresponding author:** kadivar.ali@sku.ac.ir