

ANALISI COMPUTERIZZATA DEL LIQUIDO SEMINALE DI COLOMBO (*COLUMBA LIVIA*)

COMPUTERIZED VIDEOMICROGRAPHY ANALYSIS OF PIGEON (*COLUMBA LIVIA*) SEMEN

FRANCO MARTELLI ⁽¹⁾, CLAUDIO SIGHIERI ⁽¹⁾, AUGUSTO DELLA LONGA ⁽¹⁾,
CHIARA VILLANI ⁽¹⁾, MICHELE DUCCI ⁽¹⁾, ANGELO GAZZANO ⁽¹⁾

RIASSUNTO

La mancanza di valore predittivo dell'esame tradizionale del liquido seminale ha condotto alla messa a punto di nuove metodiche di indagine che offrano maggiore oggettività nella valutazione della qualità del seme. La videomicrografia computerizzata fornisce utili indicazioni sui parametri cinetici dello spermatozoo ma necessita di una fase preliminare di calibrazione dell'attrezzatura per adattarla a riconoscere gli spermatozoi delle diverse specie animali. In questa ricerca sono stati valutati i parametri di calibrazione del Cell-Trak perché possa essere utilizzato per l'esame computerizzato del seme di colombo ed i risultati sono stati comparati con quelli ottenuti con il sistema semi-automatico Cell-Count. L'analisi statistica ha permesso di evidenziare l'esistenza di una correlazione positiva tra i valori di Velocità Cellulare Media (VCM) ottenuti con il Cell-Count ed i parametri cinetici ottenuti con il Cell-Trak, quali la Velocità Curvilinea Media (VCL; $r = 0,85$; $p < 0,001$) e la Velocità Rettilinea Media (VSL; $r = 0,74$; $p < 0,01$). I valori di motilità percentuale (MOT%) ottenuti con il Cell-Count ed il Cell-Trak risultavano statisticamente differenti tra di loro ($p < 0,05$) ma positivamente correlati ($r = 0,82$; $p < 0,01$).

Parole chiave: colombo, spermatozoo, videomicrografia computerizzata.

SUMMARY

In this research, computer-aided analysis of pigeon semen was performed. The data obtained with an automatic instrument for computerised videomicrography (Cell-Trak) were compared with data obtained with a semi-automatic system for image analysis (Cell-Count). A positive correlation was found between Cellular Mean Velocity (VCM) values obtained by using Cell-Count and, respectively, Curvilinear Mean Velocity (VCL; $r = 0.85$; $p < 0.001$) and Straight Mean Velocity (VSL; $r = 0.74$; $p < 0.01$) obtained by using Cell-Trak. The results of sperm motility percentages (MOT%) obtained with two instruments were statistically different ($p < 0.05$) but positively correlated ($r = 0.82$; $p < 0.01$). In conclusion Cell-Trak can be usefully utilised for sperm pigeon analysis.

Key words: pigeon, spermatozon, computerised videomicrography.

⁽¹⁾ Dipartimento di Anatomia, Biochimica e Fisiologia Veterinaria - Direttore Prof. Carlo Benvenuti.

INTRODUZIONE

La valutazione della fertilità maschile, sia in campo umano che veterinario, si basa soprattutto sull'analisi del liquido seminale, tuttavia i tradizionali parametri che sono presi in considerazione quali la concentrazione spermatica, la percentuale di spermatozoi mobili e percentuale di forme normali non riescono sempre a distinguere tra individui fertili ed infertili (Polansky & Lamb, 1988). La mancanza di valore predittivo dell'esame del liquido seminale è dovuto essenzialmente a due ordini di problemi; da un lato esiste il problema della soggettività delle metodiche classiche che si basano sull'osservazione manuale microscopica del campione e che sono alquanto legate all'esperienza dell'operatore. Dall'altra parte si pone un vero e proprio problema biologico, rappresentato dai limiti della significatività dei parametri tradizionali stessi. La ricerca di un marker della fertilità ha condotto alla messa a punto di nuovi test ed al perfezionamento di quelli già esistenti, con l'introduzione di nuove attrezzature che hanno migliorato l'oggettività dei risultati. È questo soprattutto, il caso della valutazione della motilità spermatica che negli ultimi anni è stata determinata in modo oggettivo grazie all'utilizzo di analizzatori di immagine che hanno fornito importanti notizie riguardo alle diverse componenti della velocità cellulare. L'applicazione di queste nuove tecniche di indagine a specie diverse da quella umana, richiede però una fase preliminare di studio in modo da individuare i parametri da indicare allo strumento nell'identificazione delle cellule in esame, in quanto gli spermatozoi differiscono grandemente tra le diverse specie sia per quanto riguarda le dimensioni che per la velocità ed il tipo di movimento della cellula. Scopo del presente lavoro è stato quello di valutare la motilità ed i parametri cinetici correlati degli spermatozoi di colombo utilizzando due diverse apparecchiature per la videomicrografia computerizzata.

MATERIALI E METODI

Il seme è stato raccolto con la tecnica del massaggio (Bogdonoff e coll., 1954) da 11 colombi (2-3 anni di età), stabulati singolarmente, in accordo con il D. Lg. 116/92 relativo alla tutela del benessere degli

animali utilizzati a fini sperimentali. Per quanto riguarda i parametri cinetici spermatici, la velocità cellulare media (VCM; μ/s) è stata determinata utilizzando il sistema di analisi di immagine semi-computerizzato "Cell-Count" (Motion Analysis Corp., Santa Rosa – California) (Ducci e coll., 1994). La valutazione della velocità rettilinea media (VSL; μ/s), della velocità curvilinea media (VCL; μ/s), dei movimenti laterali della testa (ALH; μ) e della linearità (LIN) è stata effettuata utilizzando l'analizzatore d'immagine computerizzato "Cell-Trak" (Motion Analysis Corp., Santa Rosa - California), settato con i parametri riportati in Tabella I. La motilità percentuale (MOT%) spermatica è stata determinata utilizzando entrambi gli strumenti.

Tab. I. Parametri di calibrazione del Cell-Trak.

N° frame/s	30
Durata cattura dati (n° frame)	20
Lunghezza minima della traccia (n° frame)	5
Velocità minima della cellula (μ/s)	8
Velocità massima della cellula (μ/s)	500
Dimensione cellulare minima (pixel)	1
Dimensione cellulare massima (pixel)	5
Pixel adiacenti per ricerca del centroide X	4
Pixel adiacenti per ricerca del centroide Y	2

Per la valutazione dei parametri cinetici un'aliquota di seme era adeguatamente diluita con soluzione di Tyrode addizionata di siero albumina bovina (0,5%), fino ad ottenere una concentrazione spermatica non superiore a 20 milioni di spermatozoi per millilitro.

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il test della regressione di Pearson ed il test ANOVA.

RISULTATI

I dati relativi ai parametri cinetici seminali sono riportati in Tabella II.

Tab. II. Parametri cinetici seminali nei colombi.

Colombo	MOT% (Cell-Count)	MOT% (Cell-Trak)	VCM (μ/s)	VCL (μ/s)	VSL (μ/s)	LIN	ALH (μ)
1	75	48	76	90	42	52	9,5
2	52	64	95	95	45	53	9
3	53	65	108	96	45	58	9,2
4	62	50	106	91	57	62	9
5	96	35	67	86	46	59	8,2
6	72	53	75	86	53	64	8,1
7	58	53	72	93	44	52	9,3
8	53	68	58	82	31	42	9,3
9	54	64	78	90	44	51	8,7
10	76	47	88	89	58	58	9
11	91	54	122	101	69	68	8,2
Media	65,18	52,45	85,91	90,82	48,54	56,27	8,86
\pm D.S.	13,49	12,37	19,72	5,31	10,11	7,23	0,49

L'analisi statistica ha permesso di evidenziare l'esistenza di una correlazione positiva tra i valori di VCM e la VCL ($r = 0,85$; $p < 0,001$) e tra i valori di VCM e la VSL ($r = 0,74$; $p < 0,01$). I valori di MOT% ottenuti con il Cell-Count ed il Cell-Trak risultavano statisticamente differenti tra di loro ($p < 0,05$) ma positivamente correlati ($r = 0,82$; $p < 0,01$).

DISCUSSIONE

Questa ricerca riporta i risultati della prima applicazione di una metodica di analisi computerizzata nella valutazione dei parametri cinetici seminali del colombo. Il sistema microcinematografico Cell-Trak è composto da un microscopio a contrasto di fase, cui è collegata una videocamera monocromatica ad alta risoluzione che riprende le immagini ingrandite degli spermatozoi situati nella Camera di Makler. Le immagini sono trasferite ad un video-processore che opera la digitalizzazione dell'immagine, cioè la sua trasformazione in un'immagine suddivisa in un certo numero di pixel (il pixel è la più piccola area unitaria di misura di un'immagine digitalizzata).

L'immagine digitalizzata dello spermatozoo è costituita da un contorno che appare sul monitor accanto alla cellula osservata in real-time. I contorni vengono messi a fuoco grazie al controllo del "threshold" (toni di grigio). La scelta del threshold permette all'operatore di eliminare le immagini del materiale particellato più piccolo, il cui effetto di disturbo può essere ulteriormente attenuato inserendo un filtro di fondo. Le coordinate digitalizzate dei pixel che definiscono i contorni di ogni testa di spermatozoo sono trasmesse ad un personal computer per l'elaborazione dei dati. Il primo passo consiste nella determinazione del centroide di ogni contorno. Per centroide si intende la posizione media definita da due coordinate x ed y di un gruppo di pixel. Due parametri definiscono il numero minimo e massimo di pixel che il contorno deve comprendere. Questi parametri sono di estrema importanza perché permettono l'identificazione della cellula da parte del software. Nel caso degli spermatozoi di colombo, considerate le dimensioni ridotte della cellula, il numero minimo di pixel è stato fissato ad 1 e quello massimo a 5. Altri parametri da valutare attentamente sono la velocità minima e massima della cellula. L'indicazione della velocità minima è di estrema importanza perché permette allo strumento di non considerare mobili tutte quelle cellule che potrebbero avere dei lievi movimenti passivi, derivanti, ad esempio, da urti con altri spermatozoi. La velocità massima non deve avere un valore troppo elevato per evitare di collegare tra di loro traiettorie di cellule diverse, anche se gli spermatozoi degli uccelli possiedono una velocità sia curvilinea che lineare assai maggiori di quelli umani. Nel caso degli spermatozoi di piccione la velocità minima è stata settata a $8 \mu/s$, leggermente inferiore a quella dello spermatozoo umano ($10 \mu/s$) mentre la velocità massima è stata impostata a $500 \mu/s$, assai maggiore di quella degli spermatozoi umani ($300-400 \mu/s$). L'ultimo parametro da considerare è l'indicazione del numero di pixel di cui il centroide può spostarsi sul piano delle x e delle y . Tale spostamento è definito utilizzando un'area "maschera" attorno ad ogni centroide. Se il centroide nel campo successivo non si trova all'interno di quest'area di probabilità, non viene riconosciuto come facente parte dello stesso tracciato. I valori impostati per gli spermatozoi di colombo sono rispettivamente di 4 e 2 pixel per l'asse delle x e per quello delle y .

La determinazione dei parametri cinetici seminali nel colombo, effettuata applicando i suddetti valori di taratura dello strumento, si è

rivelata di facile esecuzione. Il confronto tra i valori ottenuti per la VCM con il Cell-Count ed i valori della VCL e VSL ottenuti con il Cell-Trak ha messo in evidenza l'esistenza di una correlazione positiva statisticamente significativa, che dimostra l'attendibilità dell'analisi effettuata con la strumentazione automatica. I valori relativi alla MOT% ottenuti con il Cell-Trak risultano significativamente inferiori a quelli ottenuti con il Cell-Count, probabilmente per la presenza di particellato di fondo che viene interpretato dallo strumento come cellule immobili. Questo fatto limita anche in questa specie, come già per il coniglio, l'utilizzo di tale attrezzatura per la valutazione di questo parametro seminale.

Inoltre è da tenere presente che nella determinazione semi-automatica dei parametri cinetici effettuata con il Cell-Count, non esiste un valore soglia di velocità al di sotto del quale uno spermatozoo è considerato immobile; ciò potrebbe portare ad un errore di valutazione sia della MOT% (che risulterà aumentata) che della VCM (che risulterà ridotta) in campioni troppo concentrati in cui gli spermatozoi immobili vengono urtati da altre cellule.

In conclusione l'uso di una metodica completamente automatizzata per la valutazione dei parametri cinetici del seme di colombo può essere utilmente impiegata per fornire importanti informazioni sulla qualità del seme di questa specie animale al centro di un crescente interesse soprattutto per le problematiche legate alla sua eccessiva diffusione in ambiente urbano.

BIBLIOGRAFIA

- POLANSKY F.F., LAMB E.J. (1988). Do the results of semen analysis predict future fertility? A survival analysis study. *Fert. Steril.*, 49: 1059-63.
- BOGDONOFF P.D., SHAFFNER C.S. (1954). The effects of pH on in vitro survival, metabolic activity and fertilising capacity of chicken semen. *Poult. Sci.*, 33: 665-669.
- DUCCI M., GAZZANO A., SIGHIERI C., FRATESCHI T.L., MARTELLI F. (1994). HOS-Test and other seminal characteristics in fresh rabbit semen after gradient separation on BSA. *Ann. Fac. Med. Vet.*, 47: 203-212.