

КРАТКИЕ
СООБЩЕНИЯ

УДК 597.587.9:591.463.11:004.42

**ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ХАРАКТЕРИСТИК
ПОДВИЖНОСТИ СПЕРМАТОЗОИДОВ РЫБ С ПОМОЩЬЮ
КОМПЬЮТЕРНОЙ ПРОГРАММЫ IMAGEJ И МАКРОСОВ EXCEL**

© 2019 г. Ю. С. Баяндина¹, *, А. Н. Ханайченко¹

¹Институт морских биологических исследований РАН – ИМБИ, Севастополь, Республика Крым, Россия

*E-mail: sepulturka@mail.ru

Поступила в редакцию 30.11.2017 г.

После доработки 24.01.2018 г.

Принята в печать 01.03.2018 г.

Описан метод компьютерного определения характеристик движения сперматозоидов рыб с помощью программы ImageJ, а также ряд авторских макросов для Excel, оптимизирующих обработку полученных с помощью плагина wrMTrack_Batch данных, которые апробированы на сперме черноморской камбалы-калкана *Scophthalmus maeoticus*.

Ключевые слова: камбала-калкан *Scophthalmus maeoticus*, сперма, подвижность сперматозоидов, ImageJ, CASA, wrMTrack_Batch.

DOI: 10.1134/S0042875219010016

Эффективность нереста рыб в естественных популяциях, как и их воспроизводство в условиях искусственного выращивания, в значительной степени определяются репродуктивными характеристиками самцов. Наиболее достоверной характеристикой качества сперматозоидов является успешность оплодотворения (при условии качественных женских гамет). На успешность оплодотворения влияет множество факторов как в период до момента проникновения сперматозоида в микропиле икры, так и в процессе слияния его пронуклеуса с пронуклеусом яйцеклетки (Holt et al., 2004). Качество спермы самцов рыб оценивают по их двигательной активности в соответствии с морфологическими, физиологическими и биохимическими показателями. Вариабельность показателя оплодотворения чаще всего положительно коррелирует со скоростью движения сперматозоидов. Поэтому наиболее информативными методами определения качества и жизнеспособности клеток спермы являются функциональные тесты, определяющие характеристики движения сперматозоидов (Fauvel et al., 2010). К ним относятся такие показатели, как скорость движения сперматозоидов по прямолинейной и криволинейной дистанциям и доля подвижных сперматозоидов.

Для успешного осеменения икры рыб в искусственных условиях необходимо проведение качественной и быстрой предварительной оценки половых продуктов самцов (Павлов, 2006). В последнее время широкое распространение получили методы компьютерного анализа качества спермы, значи-

тельно упрощающие получение и обработку количественных данных (Rurangwa et al., 2004). Многие исследователи используют программу ImageJ с подключёнными плагинами CASA (Sanches et al., 2013; Suquet et al., 2016) или MTrack2 (Павлов, 2006; Емельянова и др., 2015). Оба плагина предполагают начальную графическую модификацию каждого видеоролика и ручной перенос данных, полученных в ImageJ, в статистические программы. Подобная обработка и анализ данных при наличии большого количества проб требуют огромных затрат времени исследователя.

Цель работы – разработать и оптимизировать алгоритм определения характеристик движения сперматозоидов рыб с помощью программы ImageJ на модельном объекте – черноморской камбале-калкане *Scophthalmus maeoticus*.

Для определения характеристик спермы использовали собственную модификацию метода компьютерного анализа (Баяндина, 2013) с помощью трёх компьютерных программ: VirtualDubMod – для захвата изображения и обработки образов, ImageJ – для анализа изображений и Microsoft Excel – для анализа полученных данных. Видеосъёмку проводили с помощью инвертированного микроскопа NikonEclipse с подсоединённой аналоговой видеокамерой.

По полученным в ImageJ длинам пути каждого сперматозоида рассчитывали скорости движения сперматозоидов по криволинейной и прямолинейной дистанциям (мкм/с) и долю подвижных

сперматозоидов для каждого образца (%). В соответствии с принятой системой оценки подвижности спермы рыб (Burness et al., 2005; Павлов, 2006) и собственными предварительными экспериментами сперматозоиды со скоростью <20 мкм/с считали малоподвижными и не учитывали при подсчёте средних скоростей.

Индивидуальные характеристики спермы определили у 15 самцов калкана, отловленных в Чёрном море в 2012 (8 экз.) и 2013 (7 экз.) гг. Пробы отбирали стерильными одноразовыми шприцами на борту научно-исследовательского судна непосредственно после поимки живой рыбы камбальными жаберными сетями с размером ячеи 200 мм. В период между отбором проб и их доставкой в лабораторию для оценки качества спермы (в течение 2–4 ч) шприцы со спермой без доступа воздуха и влаги находились в термосе под слоем льда (4–6°C). Для исследования характеристик подвижности сперматозоидов 0.1 мл спермы разбавляли охлаждённой (до 15°C) фильтрованной морской водой в соотношении 1 : 10 в двух повторностях. После разбавления сперма находилась в стерильном планшете при комнатной температуре.

Видеорегистрацию проводили в капле спермы, отобранной из планшета сразу после разбавления и через равные промежутки времени (5 мин), при увеличении микроскопа $\times 100$. Видеосъёмку проводили в толще капли без использования покровного стекла, наличие которого приводит к уменьшению количества свободно перемещающихся сперматозоидов (Баяндина, 2013). В процессе видеозаписи поле зрения меняли, выбирая участки с наиболее подвижными клетками. Многие активные сперматозоиды быстро уходят из поля зрения, в связи с этим их подвижность регистрировали на протяжении коротких (0.5 с) отрезков времени. В программе VirtualDubMod нарезали каждый видеоролик в трёх разных полях зрения по 15 кадров. Полученные ролики (три для каждой повторности, т.е. 9 шт. для каждой пробы) сохраняли отдельными файлами (405 видеофайлов) с частотой 25 кадров в секунду, не содержащими аудиодорожку.

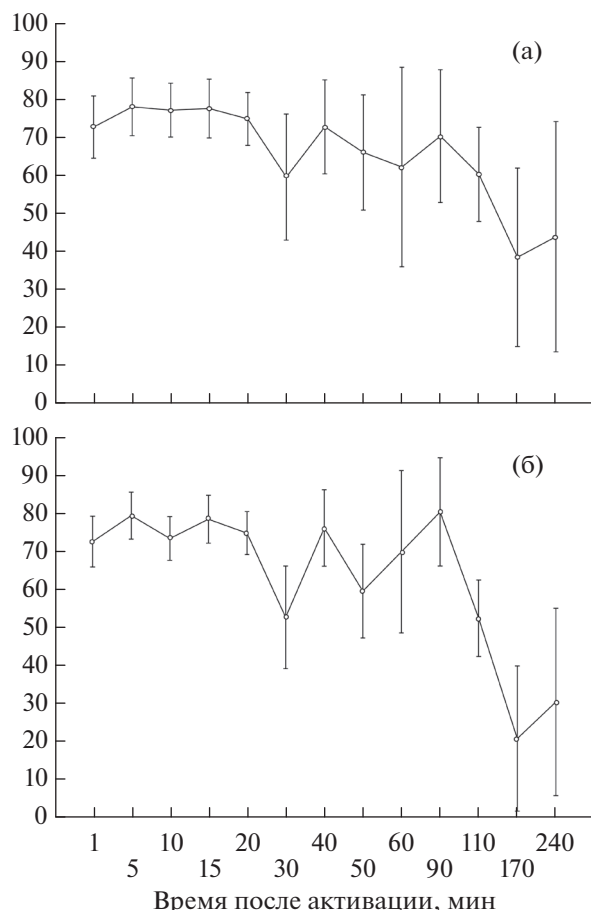
Видеозапись анализировали в программе ImageJ с помощью стандартного функционала и установленного плагина wrMTrack_Batch; все измерения регистрировали в пикселях (пк). Минимальные и максимальные размеры объекта определяли с помощью выделения Oval selection и вручную измеряли площади головки самого малого и самого большого сперматозоидов, наблюдаемых на протяжении всего видеоролика. Далее определяли площадь головок (Analyze/Measure). Для измерения максимальной скорости перемещения объекта между кадрами фиксировали дистанцию, преодолеваемую одним из самых быст-

рых сперматозоидов между двумя соседними кадрами, обозначив инструментом Straight Line начальную точку на первом кадре, а конечную — на втором; затем определяли длину отрезка (Analyze/Measure). В поле зрения находилось около 1000 сперматозоидов, площадь их головок варьировала в пределах 3–90 пк², т.е. объекты находились достаточно близко друг к другу. Скорость движения, подсчитанная вручную с помощью инструмента Straight Line, была равна 3–10 пк/кадр. Максимальную скорость устанавливали 20 пк/кадр. При значительном уменьшении этого параметра не учитывается часть быстро движущихся сперматозоидов, при уменьшении — программа ложно распознаёт соседние объекты. Минимальное количество кадров, в течение которых движется объект, выставляли равным 5–7, так как сперматозоиды быстро уходят из поля зрения. Изменение площади объекта выставляли равным 90% в связи с тем, что сперматозоид может частично уходить в толщу жидкости и в процессе видеозаписи меняется видимая часть его головки.

Концентрацию сперматозоидов в эякуляте (кл/мл) подсчитывали в камере Горяева. Для этого сперму разбавляли морской водой в соотношении 1 : 100 в двух повторностях для каждой пробы. Заполненную камеру помещали под микроскоп и записывали видео с изменением глубины резкости. В полученных видеороликах с помощью программы VirtualDubMod вырезали видимую область с линейными параметрами, равными размерам большого квадрата камеры Горяева (0.2 \times 0.2 мм). Таким образом, один ролик содержал запись всех сперматозоидов в объёме жидкости над квадратом, образованным большими делениями сетки камеры. Для подсчёта концентрации сперматозоидов в 1 мл регистрировали пять таких квадратов для каждой пробы.

Для определения значений скоростей движения всех объектов в кадре, медиан и средних, доверительных интервалов, а также для подсчёта доли подвижных сперматозоидов в пробах (число сперматозоидов в кадре, движущихся со скоростью >20 мкм/с относительно общего числа сперматозоидов, %) были написаны макросы под Excel, позволяющие обрабатывать txt-файлы с данными.

В результате анализа проб спермы калкана с помощью модифицированного метода получены следующие данные (в среднем по всем пробам): скорость движения сперматозоидов по криволинейной дистанции — 76 ± 40 мкм/с, по прямолинейной — 55 ± 43 мкм/с, доля подвижных сперматозоидов — 67%, концентрация — $3.6 \pm 1.4 \times 10^9$ кл/мл. Установлено, что сразу после активации спермы морской водой и в течение первых 20 мин доля подвижных сперматозоидов практически во всех пробах остаётся высокой, через 30 мин после ак-



Скорость движения сперматозоидов по криволинейной дистанции (VCL, мкм/с) (а) и доля подвижных сперматозоидов, % (б) в течение 240 мин после активации спермы восьми самцов черноморской камбалы-калкана *Scophthalmus maeoticus*; (—○—) — средние значения, (I) — средние квадратичные отклонения.

тивации показатели активности достоверно снижаются (рисунок).

Плагин MTrack2 разработан для вычисления скоростей движения любых объектов (Stuurman, 2009), плагин CASA — специально для определения характеристик активности сперматозоидов (Wilson-Leedy, Ingermann, 2007). При использовании обоих плагинов алгоритм обработки видеофайлов, внесение начальных данных в ImageJ, сохранение данных в формате txt и их дальнейший перенос в Excel (или другую сходную программу) производится вручную для каждой пробы. Получение данных при анализе видеозаписей крайне трудоёмко и требует больших затрат времени.

Применение плагина wrMTrack_Batch (Nussbaum-Krammer et al., 2015) позволяет избежать повторения рутинных действий и предоставляет исследователю большую свободу в выборе параметров, наиболее подходящих для анализа движения различных объектов, в частности: обрабаты-

вать разные типы видеофайлов (сxd, avi, zip, mov); автоматически отделять объекты от фона (способ задаётся в начальном окне); автоматически переводить изображение в бинарное; отслеживать движения объектов, учитывая его минимальные и максимальные размеры в пикселях, максимальную скорость перемещения объекта между кадрами, изменение площади объекта; минимальное число кадров, в течение которых движется объект; производить запись дополнительных параметров (например, координат перемещения по осям x и y); пакетно обрабатывать массивы видеофайлов.

Пакетная обработка файлов значительно экономит время, позволяя подвергать анализу целые папки с вложенными видеофайлами. После обработки видеофайлов плагин wrMTrack_Batch автоматически сохраняет результаты для каждого файла отдельно в формате txt (с именем соответствующего видеофайла).

Написанные авторами макросы под Excel облегчают и ускоряют анализ данных, сохранённых в формате txt. Макросы для сбора txt-файлов для каждой пробы и создания результирующих таблиц по всем пробам позволяют выбирать отдельные txt-файлы, создают таблицы с подсчитанными характеристиками движения сперматозоидов и сохраняют полученные xls-файлы под заданными именами. Применение плагина wrMTrack_Batch в программе ImageJ и написанных макросов для Excel целесообразно для определения характеристик движения большого числа мелких объектов, таких как сперматозоиды рыб. При наличии большого массива обрабатываемых видеофайлов описанный в статье алгоритм позволяет избежать выполнения огромного количества рутинных действий по обработке каждого видеофайла в отдельности. На создание сводной таблицы характеристик движения сперматозоидов из 405 нарезанных видеороликов затрачивается не более 30 мин.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают искреннюю благодарность В.Е. Гирагосову (ИМБИ РАН) за отбор и доставку проб спермы калкана, а также за ценные научные консультации.

Работа выполнена в рамках государственного задания — тема № АААА-А18-118021350003-6.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Баяндина Ю.С. 2013. Характеристики подвижности спермы черноморской камбалы калкана из естественных популяций // Мор. экол. журн. Т. 12. № 2. С. 11–18.
- Емельянова Н.Г., Павлов Д.А., Лыонг Б.Т., Ха В.Т. 2015. Состояние гонад, подвижность сперматозоидов и начальные стадии эмбрионального развития *Upeneus tragula* (mullidae) // Вопр. ихтиологии. Т. 55. № 2. С. 196–206.

- Павлов Д.А. 2006. Метод оценки качества спермы рыб // Там же. Т. 46. № 3. С. 384–392.
- Burness G., Moyes C.D., Montgomerie R. 2005. Motility, ATP levels and metabolic enzyme activity of sperm from bluegill (*Lepomis macrochirus*) // Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol. V. 140. № 1. P. 11–17.
- Fauvel C., Suquet M., Cosson J. 2010. Evaluation of fish sperm quality // J. Appl. Ichthyol. V. 26. № 5. P. 636–643.
- Holt W.V., Van Look K.J.W. 2004. Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory tests of semen quality // Reproduction. V. 127. № 5. P. 52–535.
- Nussbaum-Krammer C.I., Neto M.F., Brielmann R.M. et al. 2015. Investigating the spreading and toxicity of prion-like proteins using the metazoan model organism *C. elegans* // J. Vis. Exp. V. 95. e52321. doi 10.3791/52321
- Rurangwa E., Kime D.E., Ollevier F. et al. 2004. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish // Aquaculture. V. 234. № 1–4. P. 1–28.
- Sanches E.A., Marcos R.M., Okawara R.Y. et al. 2013. Sperm motility parameters for *Steindachneridion parahybae* based on open source software // J. Appl. Ichthyol. V. 29. № 5. P. 1114–1122.
- Stuurman N. 2009. MTrack2. (<https://valelab4.ucsf.edu/~nsturman/IJplugins/MTrack2.html>)
- Suquet M., Malo F., Quéau I. et al. 2016. Seasonal variation of sperm quality in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) // Aquaculture. V. 464. P. 638–641.
- Wilson-Leedy J.G., Ingermann R.L. 2007. Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters // Theriogenology. V. 67. № 3. P. 661–672.