

# Komputerowo wspomagana analiza jakości nasienia – zasady i możliwości\*

**Wojciech Nizański, Jan Twardoń, Małgorzata Klimowicz**

z Katedry i Kliniki Rozrodu, Chorób Przeżuwaczy i Ochrony Zdrowia Zwierząt  
Wydziału Medycyny Weterynaryjnej we Wrocławiu

Konwencjonalne, rutynowe metody oceny jakości nasienia *in vitro* opierają się na subiektywnym oszacowaniu ruchliwości plemników i mikroskopowej ocenie koncentracji i morfologii męskich gamet. Podstawowym problemem dotyczącym interpretacji wyników wspomnianych metod badania nasienia jest relatywnie mała po-

wtarzalność i zróżnicowanie uzyskiwanych rezultatów. Uwarunkowane jest to wieloma czynnikami, z których należy wymienić: doświadczenie przeprowadzającego badanie, liczbę poddanych ocenie komórek, różnice w sporządzaniu preparatów, trudności z wizualną oceną charakterystyki ruchu plemników (1, 2). Przeprowadzenie miarodaj-

nej analizy ruchliwości plemników metodą mikroskopową nastręcza wiele trudności. Uzyskiwane wyniki uzależnione są przede wszystkim od temperatury ocenianej próbki oraz wprawy przeprowadzającego badanie. Prowadzi to do różnic uzyskiwanych rezultatów przy ocenie tego samego ejakulatu przez różne osoby lub laboratoria. Różnice pomiędzy wynikami subiektywnej oceny właściwości ruchowych plemników jednego ejakulatu sięgają 30–60% (2).

W celu ograniczenia zróżnicowania wyników badania nasienia doskonalono wiele urządzeń oraz systemów analogowo–komputerowych i komputerowych. Zaproponowano w tym zakresie kilka metod, takich jak analizę fotometryczną, turbidymetrię oraz spektroskopię laserowo–dopplerowską (3, 4, 5). Komputerowo wspomagana analiza jakości nasienia (computer assisted sperm analysis

\* Referat wygłoszony 13 X 2005 r. w Krakowie podczas 17. spotkania lekarzy weterynarii Unii Europejskiej zajmujących się inseminacją.

## Computer assisted sperm analysis – principles and possibilities

Niżański W., Twardoń J., Klimowicz M. • Department and Clinic of Reproduction, Ruminant Diseases and Animal Health Protection Faculty of Veterinary Medicine, Agricultural University of Wrocław.

Conventional routine methods of *in vitro* evaluation of semen quality have been based on subjective estimation of spermatozoal motility and microscopic examination of sperm concentration and morphology. These methods major limitation is the high coefficient variation in results interpretation depending on many factors - technician skills and experience, the number of evaluated spermatozoa, subtle differences in sample preparation, the conditions applied for sperm motility test and many others. Thus, there is a strong need to introduce computer assisted sperm analysis (CASA) for animals reproduction and for veterinary purposes. This method has been used for more than 25 years to evaluate human sperm. Track analysis of an individual spermatozoon allows to assess accurately the total sperm motility, progressive motility, velocity parameters, linearity of spermatozoal movement and also morphology of the cell. This article presents principles of CASA to encourage veterinarians to use this method as a routine in animals breeding and reproduction programmes.

**Keywords:** semen, computer-aided evaluation.

– CASA) jest wykorzystywana z powodzeniem od ponad 25 lat w celach praktycznych i badawczych, zarówno przez ośrodki terapii zaburzeń płodności człowieka, jak i ośrodki rozrodu zwierząt (6, 7). Automatyczna ocena poddanych analizie torów ruchu poszczególnych plemników pozwala na szybkie i dokładne obliczenie odsetka plemników ruchliwych, odsetka plemników o ruchu postępowym oraz na opis wielu właściwości związanych z szybkością i liniowością ruchu plemników. Analityzatory umożliwiają ponadto przeprowadzenie zautomatyzowanej oceny morfologii plemników. W ośrodkach leczenia zaburzeń płodności człowieka systemy CASA wykorzystywane są w głównie w celu oceny jakości nasienia przed przeprowadzeniem procedur wspomaganego rozrodu (8).

Wykazano, że wiele właściwości plemników ocenianych za pomocą systemów CASA koreluje z płodnością (2). W ośrodkach rozrodu zwierząt i weterynaryjnych centrach badawczych systemy CASA są stosowane przede wszystkim w celu oceny płodności samca oraz do analizy oddziaływania stosowanych mediów lub leków na jakość nasienia (9, 10, 11, 12).

### Ustawienia wstępne systemów CASA

Dotychczas opracowano kilka różnych systemów CASA produkowanych za-

równy w Europie, jak i USA, działających w ogólnym zarysie w oparciu o podobne zasady. Urządzenia te wymagają standaryzacji i wprowadzenia właściwych ustawień wstępnych umożliwiających poprawne przeprowadzenie badania (13, 14). Procedury te są niezbędne w celu właściwej identyfikacji plemników oraz umożliwienia rozróżnienia pomiędzy główkami plemników a innymi komórkami, fragmentami komórek oraz innymi elementami obecnymi w próbce. Każdy gatunek zwierząt wymaga zdefiniowania innych ustawień wstępnych urządzenia. Dotyczy to zwłaszcza temperatury komory z próbką, intensywności kontrastu i wielkości plemników, częstotliwości odświeżania obrazu, liczby analizowanych w sekwencji obrazów, danych związanych z szybkością i liniowością ruchu plemników niezbędnych do identyfikacji populacji plemników o ruchu prawidłowym, plemników wykazujących aktywność ruchową i komórek statycznych (tab. 1). Uzyskane wyniki są miarodajne, jeśli całkowita liczba poddanych analizie plemników jest duża. Analiza powinna być przeprowadzana w kilku różnych miejscach komory z próbką, a minimalna liczba komórek ocenianych powinna być większa od 100 (2). Koncentracja plemników w nasieniu natywnym jest zbyt wysoka do analizy toru ruchu, po których poruszają się poszczególne plemniki. Niezbędne jest zatem rozrzedzenie nasienia do koncentracji pozwalającej na poprawną analizę ścieżek ruchu plemników. Wyjątkiem w tym zakresie są przypadki oligospermii oraz nasienie w wysokim stopniu rozrzedzone w celach badawczych lub konserwacji. Badanie nasienia rozrzedzonego w rozrzedzalniku zawierającym żółtko jaja kurzego wymaga użycia specyficznych ustawień początkowych i dokonania bramkowania w układzie: wielkość, intensywność i stopień wydłużenia plemników. W takich przypadkach stosowane jest także barwienie fluorescencyjne pozwalające na identyfikację intensywnej iluminacji skondensowanego DNA plemników. Postępowanie takie jest niezbędne ze względu na obecność w próbce drobnych elementów żółtka, których wielkość jest zbliżona do rozmiarów główki plemnika i w ten sposób utrudnia poprawną analizę.

### Analiza ruchliwości plemników

Oprzrzędowanie CASA analizuje tor ruchu oddzielnie dla każdego poruszającego się plemnika. Urządzenie rejestruje położenie główki plemnika w kolejno analizowanych obrazach. Tor ruchu to połączenie liniami prostymi położenia komórki w kolejnych klatkach obrazu. Systemy CASA umożliwiają przeprowadzenie klasyfikacji plemników na subpopulacje w oparciu

o cechy kinetyki plemników. Komputerowo wspomaganą analizę jakości nasienia pozwala na ocenę kilku właściwości ruchowych plemników (tab. 2). Szybkość ruchu postępowego plemnika (progressive velocity, straight velocity, VSL) jest obliczana w oparciu o odległość w linii prostej pomiędzy początkiem i końcem toru ruchu plemnika ( $\mu\text{m/s}$ ). Szybkość komórki względem zarejestrowanego toru (track speed, cell velocity, VCL) jest obliczana w oparciu o całkowity dystans odpowiadający kolejnym położeniom główki zapisanym w kolejnych klatkach ( $\mu\text{m/s}$ ). Szybkość względem ścieżki przybliżonej (path velocity, VAP) jest zdefiniowana jako średnia prędkość plemnika wzdłuż toru wyrównanego do osi plemnika ( $\mu\text{m/s}$ ). Algorytm wyównania toru ma na celu zredukowanie wpływu bocznych odchyłń główki na wyniki szybkości ruchu. Prostość ruchu plemnika (straightness, STR) jest miarą odchylenia ścieżki przybliżonej od linii prostej łączącej początkowe i końcowe położenie plemnika. Jest to stosunek VSL/VAP wyrażony w procentach. Hipotetyczna wartość prostości wynosząca 100% oznacza ruch plemnika po linii prostej. Liniowość (linearity, LIN) jest miarą odchylenia toru plemnika od linii prostej. Jest to stosunek VSL/VCL wyrażony w procentach. Amplituda bocznych odchyłń główki (amplitude of lateral head displacement, ALH) jest uśrednioną szerokością bocznej oscylacji plemnika ( $\mu\text{m}$ ). Częstotliwość bocznych odchyłń (beat cross frequency, BCF) jest miarą częstotliwości, z którą tor plemnika przecina tor przybliżony (Hz). Wykazano zależności pomiędzy powyższymi parametrami a płodnością. Stwierdzono, że wartości VCL ejakulowanych plemników są wysoko skorelowane ze skutecznością techniki zapłodnienia *in vitro* (15). Również wartość ALH ruchliwych plemników selekcyjowanych metodą swim-up była skorelowana dodatkowo ze wskaźnikami płodności (16, 17). ALH i BCF są właściwościami pozwalającymi ocenić zdolność męskich gamet do penetracji *zona pellucida*. Wykazano dodatnie korelacje pomiędzy VCL, VSL oraz całkowitą liczbą mrożonych–rozrożonych ruchliwych plemników zdeponowanych do narządu płciowego a wskaźnikami płodności (2). W badaniach własnych stwierdzono istotne obniżenie wartości VAP, VSL i VCL populacji plemników ruchliwych poddanych mrożeniu–rozrożeniu, w porównaniu do wartości notowanych bezpośrednio przed mrożeniem (ryc. 1). Doświadczenia prowadzone w Katedrze i Klinice Rozrodu Akademii Rolniczej we Wrocławiu wykazały istotne korelacje pomiędzy właściwościami rejestrowanymi przez system CASA a odsetkiem plemników żywych – wykazujących zieloną fluorescencję SYBR-14. Za-

**Tabela 1.** Ustawienia techniczne systemu CASA HTM IVOS 12.2 (Hamilton Thorne Biosciences, MA, USA) stosowane w celu analizy jakości nasienia wybranych gatunków zwierząt

Parametry techniczne	Buhaj	Knur	Ogier
Powiększenie	optyczne ×10 cyfrowe ×1,89	optyczne ×10 cyfrowe ×1,89	optyczne ×10 cyfrowe ×1,89
Częstotliwość odświeżania (Hz)	60	60	60
Liczba rejestrowanych klatek obrazu	30	45	45
Minimalny kontrast analizowanego elementu	80	46	70
Minimalna wielkość komórek poddanych analizie (pixel)	5	7	4
Intensywność widma widzialnego analizowanych elementów	70	50	106
Minimalna szybkość VAP plemników o ruchu postępowym (µm/s)	50,0	45,0	50,0
Minimalna prostota (STR) ruchu plemników o ruchu postępowym (%)	70,0	45,0	75,0
Wartość graniczna plemników o ruchu wolnym – VAP cut-off (µm/s)	30,0	20,0	20,0
Wartość graniczna plemników o ruchu wolnym – VSL cut-off (µm/s)	15,0	5,0	0,0

**Tabela 2.** Wybrane właściwości ruchowe plemników poddawane ocenie za pomocą systemów CASA (computer assisted sperm analyzers)

MOT	%	motility/ruchliwość	
PMOT	%	progressive motility/ruch postępowy	
VCL			
VAP	µm/s	average path velocity/ szybkość względem ścieżki przybliżonej	
VAP			
VSL	µm/s	straight velocity/szybkość ruchu postępowego	
VSL VCL	µm/s	cell velocity/szybkość względem zarejestrowanego toru	
ALH	µm	amplitude of lateral head displacement/amplituda bocznych odchyień główki	
BCH	Hz	beat cross frequency/częstotliwość bocznych odchyień	
STR	%	straightness/prostota = VSL/VAP x 100%	
LIN	%	linearity/liniowość = VCL/VAP x 100%	
RAP	%	rapid – subpopulation of rapid cells/plemniki o ruchu szybkim	
MED	%	medium – medium velocity/plemniki o ruchu umiarkowanym	
SLOW	%	slow – subpopulation of slow cells/plemniki o ruchu wolnym	
STATIC	%	static cells/plemniki statyczne	

leżność tę obserwowano do trzeciej doby inkubacji nasienia knura i psa, odpowiednio w temperaturze 20 i 5°C. Po trzeciej dobie inkubacji w obu przypadkach rejestrowano w systemie CASA przyspieszony spadek odsetka plemników ruchliwych, odsetka plemników o ruchu postępowym i średniej wartości VAP (ryc. 2, 3).

### Koncentracja plemników w jednostce objętości

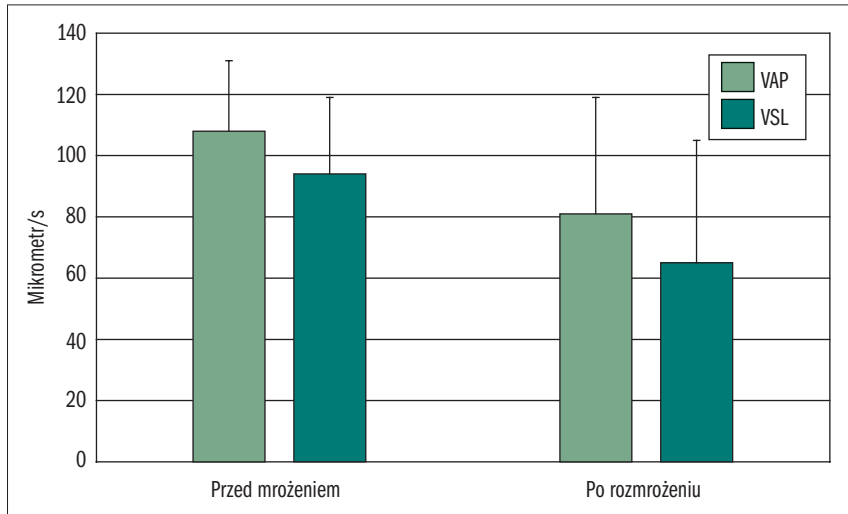
Określanie koncentracji plemników w jednostce objętości za pomocą analizatorów komputerowych stanowi jak dotychczas problem notowany w odniesieniu do każ-

dego gatunku zwierząt. Wynika on z wyraźnej tendencji systemów do przeszacowania wyników. Zjawisko to obserwowane jest w szczególności w przypadkach oceny próbek o relatywnie wysokiej koncentracji plemników w jednostce objętości. Panuje przekonanie, że przeszacowanie to związane jest z kolizjami i przecinaniem się ruchu poszczególnych plemników podczas analizy stosunkowo gęstego nasienia. Wskutek tego w następstwie przecięcia toru ruchu te same komórki identyfikowane są jako dwa następne elementy analizy. Obserwowano, że koncentracja plemników nieruchliwych, poddanych szokowi osmotycznemu za pomocą 9% NaCl,

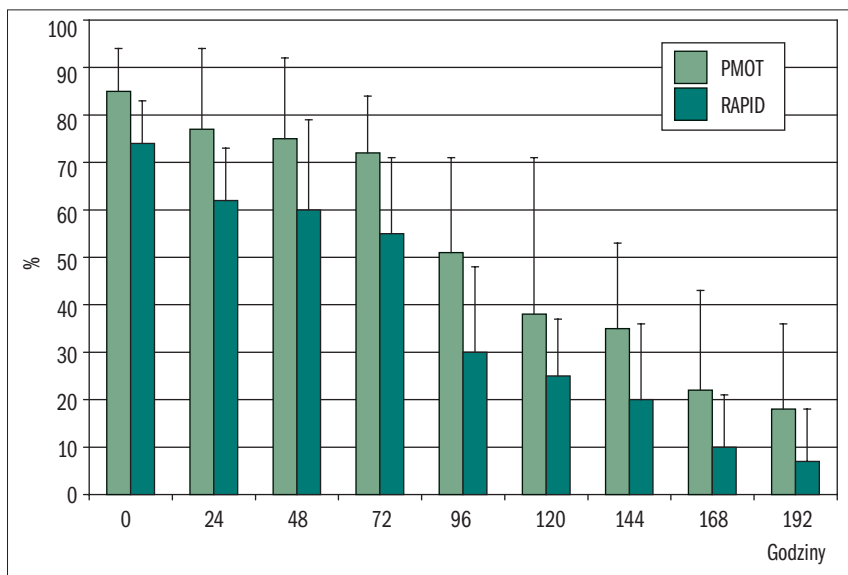
pozwala uzyskać bardziej miarodajne wyniki (1). Z drugiej strony rezultaty obliczeń koncentracji plemników w nasieniu rozmrożonym są w niektórych przypadkach niedoszacowane. Jest to prawdopodobnie spowodowane zlepianiem się części rozmrożonych plemników. W rezultacie zlepki komórkowe identyfikowane być mogą jako jeden element, co zaniża wyniki.

### Barwienie fluorescencyjne – drogą do uzyskiwania bardziej miarodajnych wyników oceny

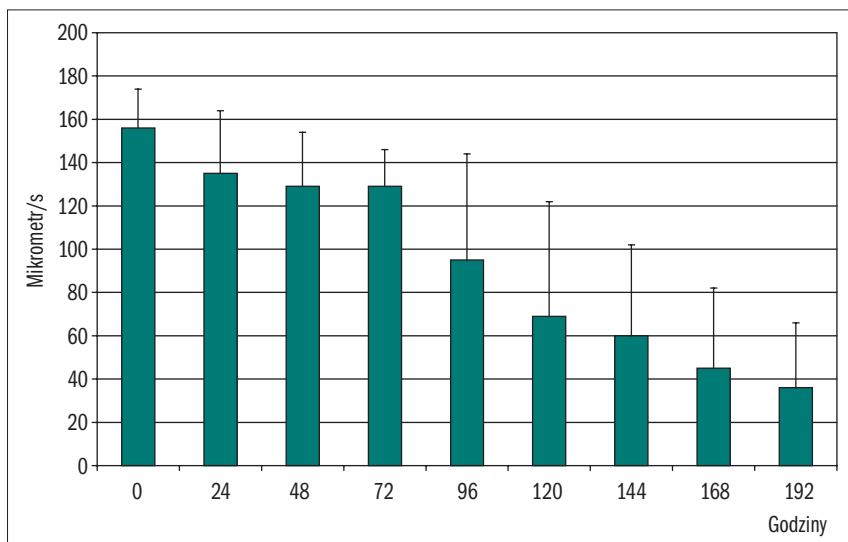
Barwienie DNA stosowane jest w celu zmniejszenia ryzyka fałszowania wyników



Ryc. 1. Szybkość względem ścieżki przybliżonej (VAP) i szybkość ruchu postępowego (VSL) plemników buhaja przed mrożeniem i po rozmrożeniu (n=6)



Ryc. 2. Odsetek plemników o ruchu postępowym oraz wielkość subpopulacji plemników o ruchu szybkim (%) w nasieniu psa rozrzedzonym rozrzedzalnikiem opartym na buforze Tris i inkubowanym w temperaturze 5°C przez 192 godziny (n=8)



Ryc. 3. Średnia szybkość ruchu plemników po ścieżce przybliżonej (VAP) w nasieniu psa rozrzedzonym rozrzedzalnikiem opartym na buforze Tris i inkubowanym w temperaturze 5°C przez 192 godziny (n=8)

uzyskiwanych w systemach CASA przez obecne w nasieniu spermatogonia, fragmenty komórkowe, komórki somatyczne i elementy żółtka jaja kurzego (18). Prawdopodobna identyfikacja plemników i odróżnienie ich od wspomnianych elementów następuje dzięki zastosowaniu barwnika fluorescencyjnego Hoechst 33342 i wzbudzeniu fluorescencji światłem stroboskopowym UV. Jedynie elementy zawierające DNA wykazują fluorescencję. Fragmenty cytoplazmy, drobiny żółtka itp. nie posiadające DNA stają się niewidoczne. Z analizy wyeliminowane mogą być ponadto komórki somatyczne. Posiadają one bowiem większe rozmiary i wykazują niższy stopień fluorescencji w porównaniu do intensywnej iluminacji haploidalnej chromatyny plemników.

Innym barwieniem fluorescencyjnym wykorzystywanym w systemach CASA jest użycie barwnika Hoechst 33258. Barwnik ten pozwala na ocenę odsetka plemników żywych i martwych w analizowanej próbce. Hoechst 33258 barwi jedynie komórki z uszkodzoną błoną komórkową, co pozwala na identyfikację plemników martwych. Analizatory CASA wykorzystują w trakcie jednej analizy zarówno światło widzialne celem oceny ruchliwości plemników, jak i fluorescencję służącą do określenia odsetka plemników posiadających błony komórkowe o przerwanej ciągłości.

### Ocena morfologii plemników za pomocą systemów CASA

Oczywista zależność pomiędzy morfologią plemników a ich zdolnością zapładniającą i wskaźnikami płodności została udowodniona przez wielu badaczy w odniesieniu do człowieka i różnych gatunków zwierząt (8, 19, 20). Poddawane współcześnie badaniom metody oceny morfologii plemników za pomocą analizatorów komputerowych polegają na klasyfikacji gamet w oparciu o porównanie niektórych rozmiarów plemnika ze zdefiniowanymi dla prawidłowych komórek wartościami minimalnymi i maksymalnymi. W analizie brane są pod uwagę następujące wymiary: długość główki ( $\mu\text{m}$ ), szerokość główki ( $\mu\text{m}$ ), pole powierzchni główki ( $\mu\text{m}^2$ ), stopień wydłużenia główki (szerokość główki/długość główki  $\times 100\%$ ), długość wtki ( $\mu\text{m}$ ). Plemniki klasyfikowane jako prawidłowe odpowiadają zdefiniowanym kryteriom. Wymiary ich główki i wtki mieścić się muszą w prawidłowych granicach, nie mogą one posiadać kropli protoplazmatycznej w położeniu bliższym i dalszym oraz muszą być wolne od jakichkolwiek wad witek.

Reasumując, komputerowo wspomaganą analizę jakości nasienia pozwala na szybką i obiektywną ocenę dużej liczby plemników i jest źródłem bardzo szczegółowych danych charakteryzujących dynamikę męskich gamet, ich żywotności

i morfologię. Należy podkreślić, że tego rodzaju urządzenia wymagają standaryzacji oraz szczególnej uwagi przy sporządzaniu preparatów poddawanych ocenie, w taki sposób, aby zapobiec uzyskiwaniu błędnych wyników. Niezaprzeczną zaletą badań jest fakt, że standaryzacja ustawień sprzętu umożliwia miarodajne porównywanie wyników oceny nasienia uzyskiwanych w różnych laboratoriach. Od kiedy dostępne są bardziej precyzyjne metody oceny ruchliwości plemników, współczesne systemy CASA pozwalają na uzyskiwanie wysoce dokładnych i powtarzalnych rezultatów, co pozwala na wprowadzenie metody do rutynowej oceny nasienia. Komputerowo wspomaganą analizę jakości nasienia dostarcza bogatszej i bardziej szczegółowej charakterystyki właściwości ruchowych plemników w porównaniu z konwencjonalną metodą mikroskopową. Dokładniejszy opis właściwości ruchowych stwarza możliwości bardziej trafnego oszacowania zdolności zapładniającej plemników.

## Piśmiennictwo

- Iguer-Ouada M., Verstegen J. P.: Evaluation of the "Hamilton Thorn computer-based automated system" for dog semen analysis. *Theriogenology* 2001, **55**, 733–749.
- Verstegen J., Iguer-Ouada M., Onclin K.: Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 2001, **57**, 149–179.
- Burkman L. J.: Discrimination between non hyperactivated and classical hyperactivity motility patterns in human spermatozoa using computerized image analysis. *Fertil. Steril.* 1991, **55**, 363–371.
- Donelly E. T., Lewis S. E., McNally J. A., Thompson W.: *In vitro* fertilization and pregnancy rates: The influence of sperm motility and morphology on IVF outcome. *Fertil. Steril.* 1998, **70**, 305–314.
- Budworth P. R., Amman R. P., Hamerstedt R. H.: A microcomputer–photographic method for evaluation of motility and velocity in bull sperm. *J. Dairy Sci.* 1987, **70**, 1927–1936.
- Agarwal A., Ozturk E., Loughlin K. R.: Comparison of semen analysis between the two Hamilton–Thorn semen analyzers. *Andrologia* 1992, **24**, 327–329.
- Dott H. M., Foster G. C.: The estimation of sperm motility in semen in semen on a membrane slide by measuring the area change frequency with an image analyzing computer. *J. Reprod. Fertil.* 1979, **55**, 161–166.
- Coetzee K., de Villiers A., Kruger T. F., Lombard C. J.: Clinical value of using automated sperm morphology analyzer (IVOS). *Fertil. Steril.* 1999, **71**, 222–225.
- Farrell P. B., Presicce G. A., Brockett C. C., Foote R. H.: Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. *Theriogenology* 1998, **49**, 871–879.
- Crockett E. C., Graham J. K., Bruemmer J. E.: Effect of cooling of equine spermatozoa before freezing on post-thaw motility: preliminary results. *Theriogenology* 2001, **55**, 793–803.
- Gil M. A., Roca J., Cremades T., Hernández M., Vázquez J. M., Rodríguez-Martínez H., Martínez E. A.: Does multivariate analysis of post-thaw sperm characteristics accurately estimate *in vitro* fertility of boar individual ejaculates? *Theriogenology* 2005, **64**, 305–316.
- Klimowicz M., Nizański W., Savić M. A., Zbyryt I., Dubiel A.: Ocena jakości nasienia psa przy zastosowaniu konwencjonalnej metody mikroskopowej, cytometru przepływowego oraz komputerowego analizatora jakości nasienia HTM IVOS. *Medycyna Wet.* 2006, w druku.
- Rijselaere T., Van Soom A., Maes D., de Kruijff A.: Effect of technical settings on canine semen motility parameters measured by the Hamilton–Thorn analyzer. *Theriogenology* 2003, **60**, 1553–1568.
- Davis D. O., Katz D. F.: Standardization and comparability of CASA instruments. *J. Androl.* 1992, **13**, 81–86.
- Holt W., Watson P., Curry M., Holt C.: Reproducibility of computer-aided semen analysis: comparison of five different systems used in a practical workshop. *Fertil. Steril.* 1994, **62**, 1277–1282.
- Liu D. Y., Clarke G. N., Baker H. W.: Relationship between sperm motility assessed with the Hamilton–Thorn motility analyzer and fertilization rates *in vitro*. *J. Androl.* 1991, **12**, 231–239.
- Sukcharoen N., Keith J., Irvine D. S., Aitken R. J.: Predicting the fertilizing potential of human sperm suspensions *in vitro*: importance of sperm morphology and leukocyte contamination. *Fertil. Steril.* 1995, **63**, 1293–1300.
- Zinamann M. J., Uhler M. L., Vertuno E., Fisher S. G., Clegg E. D.: Evaluation of computer-assisted semen analysis (CASA) semen analysis with IDENT stain to determine sperm concentration. *J. Androl.* 1996, **17**, 288–292.
- Oettle E. E.: Sperm morphology and fertility in the dog. *J. Reprod. Fert.* 1999, Suppl. 47, 257–260.
- Sekoni V. O., Gustafsson B. K.: Seasonal variations in the incidence of sperm morphological abnormalities in dairy bulls regularly used for artificial insemination. *Br. Vet. J.* 1987, **143**, 312–317.
- Rijselaere T., Van Soom A., Hoflack G., Maes D., de Kruijff A.: Automated sperm morphometry and morphology analysis of canine semen by the Hamilton–Thorne analyzer. *Theriogenology* 2004, **62**, 1292–1306.

Dr W. Nizański, Katedra i Klinika Rozrodu, Chorób Przewodzący i Ochrony Zdrowia Zwierząt, Wydział Medycyny Weterynaryjnej AR, pl. Grunwaldzki 49, 50–366 Wrocław