

FOURIER ANALYSIS AS A TOOL FOR DESCRIPTION OF STALLION SPERM HEAD SHAPE VARIABILITY

VYUŽITÍ FOURIEROVY ANALÝZY PRO POPIS VARIABILITY TVARŮ HŘEBČÍCH SPERMII

Švábová L.¹, Severa L.², Mamica O.¹, Máchal L.¹

¹ Department of Animal Breeding, Faculty of Agronomy, Mendel University of Agriculture and Forestry in Brno, Zemědělská 1, 613 00, Brno, Czech Republic

² Department of Engineering and Automobile Transport, Faculty of Agronomy, Mendel University of Agriculture and Forestry in Brno, Zemědělská 1, 613 00, Brno, Czech Republic

E-mail: xsvabova@node.mendelu.cz, severa@mendelu.cz, xmamica@node.mendelu.cz, machal@mendelu.cz

ABSTRACT

Variability of stallion sperm head shape was quantified by use of elliptic Fourier descriptors. The image analysis software Shape was used for determination of closed contours of the sperm heads (obtained through binary images with appropriate thresholds) and chain-code description. Following parameters were considered: length to width ratio, position of the center of gravity, curvature, and degree of roundness. The scores of the components were used in subsequent analysis as sperm head shape characteristic. Inverse Fourier transformation was used for visualisation of shape variation and influence of individual components. The first four principal components provide a good summary of the data, accounting for almost 90 % of the total variance. Dominant importance and relevance of length to width ratio (with contribution of 50.73 % to the total variance) as a determining parameter of sperm head shape was quantitatively confirmed.

Key words: image analysis, sperm head, Fourier descriptors

Acknowledgments: The research has been supported by project of MSMT of the Czech Republic - MSM 6215648905.

ÚVOD

Tvary a rozměry spermií se liší u různých živočišných druhů (Downing-Meisner et al., 2005) a liší se též u jedinců stejného druhu (Roldan et al., 1998; Thurston et al., 2001). Přestože jsou tvary a relativní rozměry hlaviček spermií považovány za objektivní ukazatel kvality spermatu, jejich kvantifikace je ve většině případů prováděna technickými pracovníky – jedná se tedy o subjektivní hodnocení (Saravia et al., 2007). Z tohoto důvodu bylo vyvinuto několik automatizovaných softwarových metod a postupů (Esteso et al., 2006; Saravia et al., 2007). Postupy automatické morfometrie s vysokou mírou opakovatelnosti a přesnosti vyjádření tvarů a rozměrů spermií byly vypracovány pro různé živočišné druhy (Gravance et al., 1996; Sancho et al., 1998; Thurston et al., 2001; Buendía et al., 2002; Beletti et al., 2005; Hidalgo et al., 2006; Tuset et al., 2008), a to včetně hřebců (Ball and Mohammed, 1995; Hidalgo et al., 2005). Kromě toho byly pomocí automatizovaných systémů vyjádřeny rozdíly ve velikostech spermií normálních jedinců a mezi plodnými a neplodnými hřebci (Hidalgo et al., 2008). Ovšem příprava materiálu pro popsání typ hodnocení a omezení výskytu chyb v důsledku digitalizace dat vyžaduje náročnou přípravu vzorků (Davis and Gravance, 1993).

Morfologický popis ejakulátu byl použit jako kvalitativní kritérium a kritérium fertility u hřebců i jiných samců (Bielanski, 1982; Jasko, 1990; Voss, 1981; Phillips et al., 2004) a výskyt abnormálních morfologických jevů byl popsán ve vztahu k omezené fertilitě (Jasko, 1990). V řadě prací bylo konstatováno, že vysoká variabilita morfologie spermií je citlivým ukazatelem fertility (Hingst et al., 1995; Karabinus et al., 1997 a další).

Tato práce je zaměřena na kvantifikaci a hodnocení variability tvarů hřebčích spermií. Uvažován je poměr délka/šířka, poloha těžiště, zakřivení povrchu a stupeň kruhovitosti. Byla použita metoda založená na vyjádření eliptických Fourierových deskriptorů (EFDs) (Kuhl and Giardina, 1982). Podobný postup byl s úspěchem použit při popisu různých biologických tvarů (Toayohara et al., 2000; Iwata et al. 2002; Yoshioka et al., 2004; Yoshioka et al., 2006, a další), a to včetně hlaviček spermií (Thurston et al., 2001, Belletti et al., 2005).

MATERIÁL A METODIKA

Ejakulát byl získán v březnu 2008 od plemenného hřebce Arista Z, koně holštýnského plemene, který je umístěn v Zemském hřebčinci Tlumačov, s.p. Z odebraného ejakulátu byly zhotoveny nátěry na laboratorní sklíčka a preparáty byly obarveny metodou dle B.T. Fareillyho, využívanou pro morfologické vyšetření spermií. Z obarvených preparátů byly zhotoveny fotografie hřebčích spermií pomocí mikroskopu Olympus BX51 s digitální kamerou DP70. Pro fotografování spermií bylo zvoleno tisícinásobné zvětšení za použití olejové imerze. Zpracovávalo bylo postupně 100 spermií z různých fotografií. Původní obrazové soubory byly převedeny do formátu full color (24-bit) bitmap. Příklad originální fotografie je uveden na Obr. 1.



Obrázek 1:

Obrazové soubory byly dále převedeny do odstínů šedé. Následně byly vytvořeny binární obrázky, ve kterých je objekt reprezentován hodnotou 0 (bílá) a pozadí hodnotou 1 (černá). Další zpracování souborů bylo provedeno v prostředí programu Shape (Iwata and Ukai, 2002). Uzavřené obrysy hlaviček spermií byly odečteny z binárních obrazů a byly popsány formou chain-code (Freeman, 1974). Konkrétně byl obrys popsán jako posloupnost x a y souřadnic po sobě následujících bodů na obvodu objektu (hlavičky spermie). Uvažme lineární interpolaci mezi i -tým a $(i-1)$ bodem a to, že vzdálenost počátečního bodu a p -tého bodu je označena jako t_p a délka obvodu jako T . Eliptický Fourierův rozvoj souřadnic obvodu má potom následující formu:

$$x_p = A_0 + \sum_{n=1}^{\infty} \left(a_n \cos \frac{2n\pi p}{T} + b_n \sin \frac{2n\pi p}{T} \right), \quad (1)$$

a

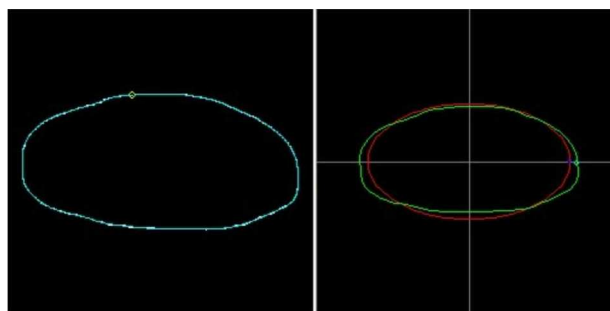
$$y_p = C_0 + \sum_{n=1}^{\infty} \left(c_n \cos \frac{2n\pi p}{T} + d_n \sin \frac{2n\pi p}{T} \right). \quad (2)$$

Podobný postup byl s úspěchem využit například při analýze variability tvarů okvětních lístků (Yoshioka et al., 2004). Pomocí metody chain-code a postupem založeným na proložení elipsou (Kuhl and Giardina, 1982) byly vypočteny koeficienty eliptických Fourierových deskriptorů. Ty byly následně normalizovány, aby byly omezeny odchylky způsobené rozdíly v rozměrech a odchylky způsobené natočením. Tímto postupem byly hlavičky spermií aproximovány pomocí prvních 20 harmonických složek, což odpovídá 77 koeficientům normalizovaných eliptických Fourierových deskriptorů. Dále byly sestaveny kovarianční matice a kvantifikovány hodnoty jednotlivých komponent. Hodnoty komponent byly dále použity při analýze variability tvaru spermií. Variabilita tvarů byla pro jednotlivé komponenty vizualizována prostřednictvím inverzní Fourierovy transformace (Rohlf and Archie, 1984; Furuta et al., 1995).

VÝSLEDKY A DISKUZE

Obecně jsou při morfometrické analýze spermií používány čtyři hlavní parametry - délka (L , m), šířka (W , m), plocha (A , m^2) a délka obvodu (P , m). Kromě toho jsou používány čtyři odvozené parametry – eliptičnost (L/W), stupeň nerovnosti povrchu ($4\pi A/P^2$), příčné prodloužení ($(L-W)/(L+W)$) a stejnoměrnost ($\pi LW/4A$). Tato práce je zaměřena na detailnější a podrobnější popis variability tvarů spermií, který je založen na obrazové analýze a výpočtu eliptických Fourierových deskriptorů. Fourierovy deskriptory byly použity pro charakteristiku a hodnocení variability tvarů býčích spermií, kde byly pro popis použity především první Fourierovy komponenty (Costa and Cesar, 2001; Ostermeier et al., 2001a,b; Beletti and Costa, 2003; Beletti et al., 2005).

V této práci byly vypočteny a vykresleny tvary hřebčích spermií, a to pomocí průměrných hodnot standardizovaných Fourierových deskriptorů. Příklad vizualizace obrysu náhodně vybrané spermie je uveden na Obr. 2. Původní obrys, odečtený metodou chain-code, je zobrazen bílou čarou v levé části obrázku. Obrys zrekonstruovaný pomocí deskriptorů je naznačen modrou čarou. Obrys sestavený na základě normalizovaných Fourierových deskriptorů je zobrazen v pravé části obrázku, a to zeleně. Elipsa zobrazená vpravo (červeně) je první harmonická elipsa.



Obrázek 2

První čtyři hlavní komponenty mají dostatečně široký popisný potenciál a postihují téměř 90 % celkové variability tvarů. Nejvýznamnější je komponent první (poměr délky a šířky), který zahrnuje 50,73 % celkové variability.

Komponent	Podíl (%)	Celkem (%)	Popisný indikátor
1	50.73	50.73	délka/šířka
2	24.54	75.27	poloha těžiště
3	10.32	85.59	zakřivení
4	3.87	89.46	stupeň kruhovitosti

Tabulka 1

Použití eliptických Fourierových deskriptorů a analýza pomocí hlavních komponent má několik výhod. Především může tento postup postihnout i velmi malé variace v tvaru objektu. Podíl druhého, třetího a čtvrtého komponentu na celkové variabilitě tvaru představuje

24,54 % pro polohu těžiště, 10,32 % pro křivost a 3,87 % pro stupeň kruhovitosti (viz. Tabulka 1).

U zvířat, která jsou často využívána k umělé inseminaci (např. kanců), byl "normální" ejakulát popsán tak, že výskyt abnormalit v tvarech hlaviček spermií nepřesahuje 10 %, žádný z několika vedlejších parametrů nepřesahuje hranici 5 % (defektní akrozomy, bičíky apod.) nebo jejich součet 10-15 % (Rodriguez-Martinez and Barth, 2007). Kvantifikace variability tvarů hlaviček spermií může tedy do jisté míry popsat nebo postihnout přítomnost abnormalit. Morfologický popis ejakulátu jako kvalitativní kritérium, a to zvláště v těch případech, kdy mají defekty jasný vztah k fertilitě, je spolehlivý pouze v případě, kdy je zpracován velký počet vzorků (Barth et al, 1992). To klade vysoké nároky na práci a čas techniků, kteří (často manuálně) tato hodnocení provádí. Samotný výsledek je do značné míry závislý na zkušenostech a znalostech těchto techniků. Vyjádření variability tvarů spermií (a interpretace pomocí jednotlivých indikátorů – poměr délka/šířka, poloha těžiště, zakřivení, stupeň kruhovitosti) tedy může představovat účinný a spolehlivý nástroj při identifikaci problematického ejakulátu.

ZÁVĚR

Fenomén detailně popsané variability tvarů hřebčích spermií je aktuálním problémem a zaslouhuje si výrazné pozornosti. Eliptické Fourierovy deskriptory a analýza tvarů pomocí hlavních komponent představují přesné a spolehlivé nástroje pro výpočet a vyjádření této variability. První čtyři hlavní komponenty postihují téměř 90 % celkové variability. Nejvýznamnější je komponent první – poměr délky a šířky hlavičky spermie (50,73 % celkové variability). Detekce drobných rozdílů v morfologii spermií může rozšířit možnosti predikční analýzy a hodnocení hřebčích spermigramu. Rozlišení drobných rozdílů ve tvarech jednotlivých spermií pouhým okem je velmi obtížné, ovšem snadno realizovatelné pomocí výpočtu hlavních komponent Fourierovou analýzou. Kromě toho prezentovaná analýza umožňuje hodnocení tvaru nezávisle na rozměrech studovaných objektů. Tato nezávislost představuje velkou výhodu, protože vizuální rozlišovací schopnost lidského oka je často omezena nebo ovlivněna faktorem rozměru. Popsaná obrazová analýza je tedy užitečnou a účinnou metodou pro objektivní popis tvarové a rozměrové variability hřebčích spermií.

LITERATURA

- Ball, B.A., Mohammed, A.O. (1995): Morphometry of stallion spermatozoa by computer-assisted image analysis. *Theriogenology* 44, 367-377.
- Barth, A. D., Oko, R. J. (1989): *Abnormal morphology of bovine spermatozoa*, 1st ed., Ames, IA: Iowa State University Press, p. 285.
- Beletti, M.E., Costa, L.F. (2003): A systematic approach to multispecies sperm morphometric characterization. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 25, 97–107.
- Beletti, M.E., da Fontoura Costa, L., Viana, M.P.(2005): A comparison of morphometric characteristics of sperm from fertile *Bos Taurus* and *Bos indicus* bulls in Brazil, *Animal Reproduction Science* 85, 105–116.
- Bielanski, W., Dudek, E., Bittmar, A., Kosiniak, K. (1982): Some characteristics of common abnormal forms of spermatozoa in highly fertile stallions. *J Reprod Fertil* 32, 21-26.
- Buendía, P., Soler, C., Paolicchi, F., Gago, C., Urquieta, B., Pérez-Sánchez, F., Bustos-Obregón, E. (2002): Morphometric characterization and classification of alpaca sperm heads using the Sperm-Class Analyzer[®] computer assisted system. *Theriogenology* 57, 1207–1218.
- Davis, R.O., Gravance, C. G. (1993): Standardization of specimen preparation, staining, and sampling methods improves automated sperm-head morphometry analysis. *Fertil Steril* 59, 412-417.
- Esteso, M.C., Soler, A.J., Fernandez-Santos, M.R., Quintero-Moreno, A.A., Garde, J.J. (2006): Functional significance of the sperm head morphometric size and shape for determining freezability in Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal sperm samples. *Journal of Andrology* 5, 662-670.
- Freeman, H. (1974): Computer processing of line drawing images, *Computer Survey* 6, 57–97.
- Gravance, C.G., Vishwanath, R., Pitt, C., Casey, P.J. (1996): Computer automated morphometric analysis of bull sperm heads. *Theriogenology* 46, 1205–1215.
- Hidalgo, M., Rodríguez, I., Dorado, J., Sanz, J., Soler, C. (2005): Effect of sample size and staining methods on stallion sperm morphometry by the Sperm Class Analyzer. *Vet. Med. - Czech.* 50, 24–32.
- Hidalgo, M., Rodríguez, I., Dorado, J. (2006): Influence of staining and sampling procedures on goat sperm morphometry using the Sperm Class Analyzer. *Theriogenology* 66, 996–1003.
- Hidalgo, M., Rodríguez, I., Dorado, J., Soler, C. (2008): Morphometric classification of Spanish thoroughbred stallion sperm heads. *Animal Reproduction Science* 103, 374–378
- Hingst, O., Blottner, S., Franz, C. (1995): Chromatin condensation in cat spermatozoa during epididymal transit as studied by aniline blue and acridine orange staining. *Andrologia* 27, 275–279.

- Iwata, H., Ukai, Y. (2002): SHAPE: A computer program package for quantitative evaluation of biological shapes based on elliptic Fourier descriptors. *Journal of Heredity* 93, 384–385.
- Iwata, H., Nesumi, H., Ninomiya, S., Takano, Y., Ukai, Y. (2002): Diallel analysis of leaf shape variations of citrus varieties based on elliptic Fourier descriptors. *Breeding Science* 52, 89–94
- Jasko, D.J., Lein, D.H., Foote, R.H. (1990): Determination of the relationship between sperm morphologic classifications and fertility in stallions. *J Am Vet Med Assoc* 197, 389–394.
- Karabinus, D.S, Vogler, C.J., Saacke, R.G., Evenson, D.P. (1997): Chromatin structural changes in sperm after scrotal insulation of Holstein bulls. *J Androl* 18, 549–55.
- Kuhl, F.P., Giardina, C.R. (1982): Elliptic Fourier features of a closed contour. *Computer graphics Image Processing* 18, 236–258.
- Ostermeier, G.C., Sargeant, G.A., Yandell, B.S., Evenson, D.P., Parrish, J.J. (2001): Relationship of bull fertility to sperm nuclear shape. *J. Androl.* 22, 595–603.
- Ostermeier, G.C., Sargeant, G.A., Yandell, T.B.S., Parrish, J.J. (2001b): Measurement of bovine sperm nuclear shape using Fourier harmonic amplitudes. *J. Androl.* 22, 584–594.
- Phillips, N.J., McGowan, M.R., Johnston, S.D., Mayer, D.G. (2004): Relationship between thirty post-thaw spermatozoal characteristics and the field fertility of 11 high-use Australian dairy AI sires. *Anim Reprod Sci* 81, 47–61.
- Rodriguez-Martinez, H., Barth, A.D. (2007): In vitro evaluation of sperm quality related to in vivo function and fertility. *Soc Reprod Fertil Suppl* 64, 39–54.
- Roldan, E.R., Cassinello, J., Abaigar, T., Gomendio, M. (1998): Inbreeding, fluctuating asymmetry, and ejaculate quality in an endangered ungulate. *Proc Biol Sci* 265, 243–248.
- Sancho, M., Pérez-Sánchez, F., Tabaldo, L., de Monserrat, J.J., Soler, C. (1998): Computer assisted morphometric analysis of ram sperm heads: evaluation of different fixative techniques, *Theriogenology* 50, 27-37.
- Saravia, F., Nunez-Martinez, I., Moran, J.M., Soler, C., Muriel, A., Rodriguez-Martinez, H., Pena, F.J. (2007): Differences in boar sperm head shape and dimensions recorded by computer-assisted sperm morphometry are not related to chromatin integrity, *Theriogenology* 2, 196-203.
- Thurston, L.M., Watson, P.F., Mileham, A.J., Holt, W.V. (2001): Morphologically distinct sperm subpopulations defined by Fourier shape descriptors in fresh ejaculates correlate with variation in boar semen quality following cryopreservation. *J. Androl.* 22, 382–394.
- Toyohara, H., Irie, K., Ding, W., Iwata, H., Fujimaki, H., Kikuchi, F., Ukai, Y. (2000): Evaluation of tuber shape of yam (*Dioscorea alata* L.) cultivars by image analysis and elliptic Fourier descriptors. *J Breed. Genet.* 32, 31–37.

Tuset, V.M., Dietrich, G.J., Wojtczak, M., Słowinska, M., de Monserrat, J., Ciereszko, A. (2008): Comparison of three staining techniques for the morphometric study of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa, *Theriogenology* 69, 1033–1038.

Voss, J.L., Pickett, S.W., Squires, E.L. (1981): Stallion spermatozoal morphology and motility and their relationship to fertility. *J Am Vet Med Assoc* 178, 287–289.

Yoshioka, Y., Iwata, H., Ohsawa, R., Ninomiya, S. (2004): Analysis of Petal Shape Variation of *Primula sieboldii* by Elliptic Fourier Descriptors and Principal Component Analysis. *Anal of Botany* 94, 657–664.

Yoshioka, Y., Iwata, H., Hase, N., Matsuura, S., Ohsawa, R., Ninomiya, S. (2006): Genetic combining ability of petal shape in garden pansy (*Viola x Wittrockiana Gams*) based on image analysis. *Euphytica* 151, 311–319.