

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



Využití hlubokých neuronových sítí při optimalizaci detekce spermií snímaných pomocí počítačem řízené analýzy spermií (computer assisted sperm analysis)

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Michala Malá

Obor studia: Reprodukční biotechnologie

Vedoucí práce: Ing. Ondřej Šimoník, Ph.D.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Využití hlubokých neuronových sítí při optimalizaci detekce spermií snímaných pomocí počítačem řízené analýzy spermií (computer assisted sperm analysis)" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 24. 7. 2020

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Ondřeji Šimoníkovi, Ph.D. za poskytnutí cenných rad, připomínky, výbornou komunikaci a vynaložený čas při vedení této diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala IT specialistům z Laboratory Imaging, s.r.o. Ondřeji Pražskému, Michalovi Kuderjavému a Jonášovi Chudému za spolupráci a poskytnuté informace. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině, a především svému příteli za pomoc a podporu během celého studia.

Využití hlubokých neuronových sítí při optimalizaci detekce spermií snímaných pomocí počítačem řízené analýzy spermií (computer assisted sperm analysis)

Souhrn

Cílem diplomové práce bylo stanovit, zda existuje významný rozdíl mezi konvenční metodou prahování a detekce spermií pro analýzu jejich motility v softwaru CASA (*computer assisted sperm analysis*) a novým přístupem využívajícím algoritmy umělé inteligence. A tím podhalit, zda je zde prostor pro zdokonalování tohoto softwaru pomocí této velmi aktuální IT technologie. CASA neboli počítačem řízená analýza spermií představuje praktický nástroj, který poskytuje rychlé a objektivní posouzení ejakulátu. V dnešní době je již běžně používán ve výzkumných i klinických laboratořích, ale stále zde existuje prostor pro vylepšení, především ve schopnosti detekovat spermie s vyšší přesností společně s reálnějším vykreslováním trajektorií. Možným řešením tohoto problému by mohla být implementace hlubokých neuronových sítí. Pro trénování neuronové sítě byl využit CASA software NIS-Elements (Laboratory Imaging s.r.o.).

Pro vytvoření tréninkového datasetu pro *supervised learning* neuronové sítě typu U-Net byl použit standardně odebraný a zpracovaný ejakulát býků, kozlů a kohoutů. Na digitalizovaných snímcích byly manuálně označeny hlavičky spermií a následně byly takto zpracované soubory předloženy síti jako tréninkový vzor. Výsledkem byla natrénovaná síť, schopná identifikovat objekty a vypracovat jejich pohybovou analýzu.

Výsledky práce ukázaly, že implementace umělé inteligence do CASA softwarů může být vhodným krokem vedoucím k relevantním modifikacím. Námi natrénovaná síť prokázala výborné výsledky především při segmentaci býčích spermií (řaděné Sp-TALP), kdy dokázala správně predikovat 92,48 % spermií, a výrazně tak předčila konvenční metodu prahování objektů. Při segmentaci koncentrovanějších vzorků kozlích a kohoutích spermií byla použita funkce NIS-Elements „*Object separate bright*“, která vylepšila schopnost sítě rozdělovat překrývající se spermie a měla pozitivní vliv na výsledek segmentace.

Protože správná identifikace hlavičky spermie je zcela zásadní pro korektní výpočet koncentrace a vypracování pohybových analýz, měli by se vývojáři NIS-Elements do budoucna zaměřit na preciznost detekce kolidujících spermií a zdokonalit software tak, aby dokázal identifikovat spermie i v suboptimálních podmínkách (extrémně koncentrované vzorky, vysoký podíl kolizí, příměsi ve vzorcích, druhově odlišný tvar hlavičky spermie). Dalšími modifikacemi softwaru by mohlo být možné využívat systém pro preciznější analýzu hyperaktivace spermií v kapacitačních podmínkách nebo stanovení reakce spermií na cizorodé látky v rámci toxikologických výzkumů.

Klíčová slova: spermie, motilita, CASA, hluboké neuronové sítě, umělá inteligence

Use of the Deep Neuronal Network for Optimization of the Sperm Detection during Their Recording with Computer Assisted Sperm Analysis

Summary

The aim of the Diploma thesis was to determine, if there is a significant difference between conventional method of threshold and detection of sperm for their motility analysis in CASA (computer assisted sperm analysis) software, and the new approach using algorithms of artificial intelligence. To expose, if there is a room for improvement of this software with this very upcoming IT technology. CASA (computer assisted sperm analysis) represents practical device, which provides fast and objective assessment of sperm. Nowadays, using of this device is common in research and clinical laboratories, but there is still space for improvement, especially, in detecting sperm with better accuracy together with more real reconstruction of trajectories. Solution for this problem could be the implementation of deep neuronal networks. For the training of neuronal networks the CASA software NIS-Elements (Laboratory Imaging l.t.d.) was used.

For creation of training dataset for supervised learning of the U-Net network standardly taken and processed ejaculate of bulls, goats and roosters was used. At digitalized screenings the heads of the sperms were manually marked. Afterwards, processed files were submitted as training pattern. The result was trained neuronal network, which was able to identify objects and elaborate their movement analysis.

The results of this thesis showed, that implementation of artificial intelligence to the CASA software could be the right step leading to relevant modifications. Network, trained by us, proved excellent results, especially with segmentation of bull sperm (diluted with Sp-TALP). Correct prediction of sperm was 92.48 %, which significantly exceeded conventional threshold method. During segmentation of more concentrated goat and rooster sperm, the NIS-Elements function „Object separate bright“ was used, which improved the ability of the network to separate covered sperms and has positive effect on the results of segmentation.

Since, right identification of sperm head is really crucial for the assessment of concentration and movement analysis, in the future, developers of NIS-Elements should focus on accurate detection of colliding sperms and improve software to identify sperms also in aggravated conditions (extremely concentrated samples, high amount of collisions, admixtures in the samples, species-different shape of sperm head). With next modifications of the software could be possible to used the system for more accurate analysis of sperm hyperactivation in capacitation conditions or assessment of sperm reaction to heterogeneous substances within toxicology research.

Keywords: sperm, motility, CASA, deep neuronal networks, artificial intelligence

Obsah

1	Úvod	1
2	Vědecká hypotéza a cíle práce	2
3	Literární rešerše	3
	3.1 Spermie	3
	3.1.1 Morfologická stavba spermie	3
	3.2 Hluboké neuronové sítě	7
	3.2.1 Biologický neuron	7
	3.2.2 Formální neuron	8
	3.2.3 Neuronová síť	9
	3.2.4 Učení neuronových sítí	11
	3.2.5 Hluboké neuronové sítě a jejich učení	13
	3.3 CASA – počítačem řízená analýza spermií	16
	3.3.1 Princip fungování CASA	16
	3.3.2 Porovnání mezi CASA a manuální analýzou	19
	3.3.3 Výhody a nevýhody CASA	20
	3.3.4 Limitující faktory a zdroje chyb v CASA	21
	3.3.5 Parametry motility v CASA	28
4	Metodika	30
	4.1 Ejakulát	30
	4.1.1 Odběr a kryokonzervace	30
	4.1.2 Příprava vzorků	30
	4.2 Zpracování vzorků spermií pomocí CASA systému NIS Elements	31
	4.2.1 Segmentace spermií pomocí Binary Toolbar nástrojů	31
	4.2.2 Tracking – analýza motility	32
	4.3 Trénování hlubokých neuronových sítí NIS-Elements	33
	4.3.1 Implementace hlubokých neuronových sítí do softwaru NIS-Elements	33
	4.3.2 Trénování hlubokých neuronových sítí	33
	4.3.3 Ověření správnosti segmentace pomocí hlubokých neuronových sítí	34
	4.4 Statistická analýza	36
	4.5 Grafický protokol procesu trénování neuronové sítě v NIS Elements	36
5	Výsledky	42
	5.1 Výsledky segmentace býčích spermií	42
	5.2 Výsledky segmentace kozlích spermií	43
	5.3 Výsledky segmentace kohoutích spermií	44
	5.4 AI motility tracking býčích spermií	46
6	Diskuze	54
7	Závěr	60
8	Literatura	61
9	Seznam použitých zkratk a symbolů	68
10	Samostatné přílohy	I

1 Úvod

Schopnost pohybu spermií hraje důležitou roli při průchodu samičím reprodukčním traktem a oplození vajíčka. Proto je motilita spermií považována za jeden z vhodných indikátorů kvality ejakulátu a bývá klíčovým parametrem pro zařazování plemeníků do chovu (Quintero-Moreno et al. 2004). Subjektivní hodnocení motility spermií je však závislé na individuálních schopnostech a zkušenostech laboratorních pracovníků, což často vede k velmi rozdílným výsledkům. Iquer-Ouada & Versteegen (2001) uvádí, že mezi subjektivním hodnocením stejného ejakulátu různými laboratorními pracovníky existuje variabilita 30-60 %. Proto dnes již většina výzkumných i klinických laboratoří (inseminační stanice, reprodukční centra) používá CASA systémy (Valverde et al. 2019).

CASA neboli počítačem řízená analýza spermií byla vyvinuta v 80. letech minulého století. Představuje praktický nástroj, který poskytuje rychlé a objektivní posouzení ejakulátu. Ovšem i zde je velký prostor pro vylepšení, především ve schopnosti detekovat spermií s vyšší přesností. Pouze při přesné identifikaci hlaviček spermií je možné správně rekonstruovat jejich trajektorie a vypracovat příslušné pohybové analýzy (Mortimer 2000). Možným řešením tohoto problému je propojení CASA s vysoce aktuální metodou hlubokých neuronových sítí a machine learning.

Hluboké neuronové sítě jsou fenoménem dnešní doby. Jedná se o nástroje umělé inteligence, které jsou inspirovány fungováním lidského mozku. Neuronové sítě jsou schopné vyřešit řadu problémů, a tak nacházejí uplatnění v rozličných oborech. Používají se při identifikaci objektů, rozpoznávání písmen, číslic, obličejů, při vyhledávání osob, porozumění řeči, při řízení autonomních automobilů a začínají se objevovat také v medicíně, například při rekonstrukci tkání, predikci nemocí apod. (LeCun et al. 2015).

Neuronové sítě se v mnoha odvětvích ukázaly jako velmi efektivní. Proto se jejich využití nabízí i v oblasti reprodukce, konkrétně při analýze spermií v CASA. Pro implementaci umělé inteligence do CASA v této diplomové práci byla IT odborníky doporučena síť U-Net. U-Net je plně konvoluční síť vyvinuta týmem Ronneberger et al. (2015) speciálně pro biomedicínskou obrazovou segmentaci. Díky své unikátní struktuře umožňuje přesnou detekci a lokalizaci vybraných objektů.

Cílem diplomové práce je zlepšení rekognice spermií v CASA softwaru NIS-Elements používaném v laboratořích KVD. V diplomové práci bude popsána morfologická stavba spermií, představeny hluboké neuronové sítě, jejich architektura a způsob učení, princip fungování CASA a faktory ovlivňující výsledky pohybových analýz spermií. Nakonec bude posouzena efektivita implementovaných neuronových sítí při identifikaci spermií.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cílem práce bylo stanovit, zda existuje významný rozdíl mezi konvenčním postupem prahování objektů (spermií) pro analýzu jejich motility a novým přístupem využívajícím algoritmy umělé inteligence.

3 Literární rešerše

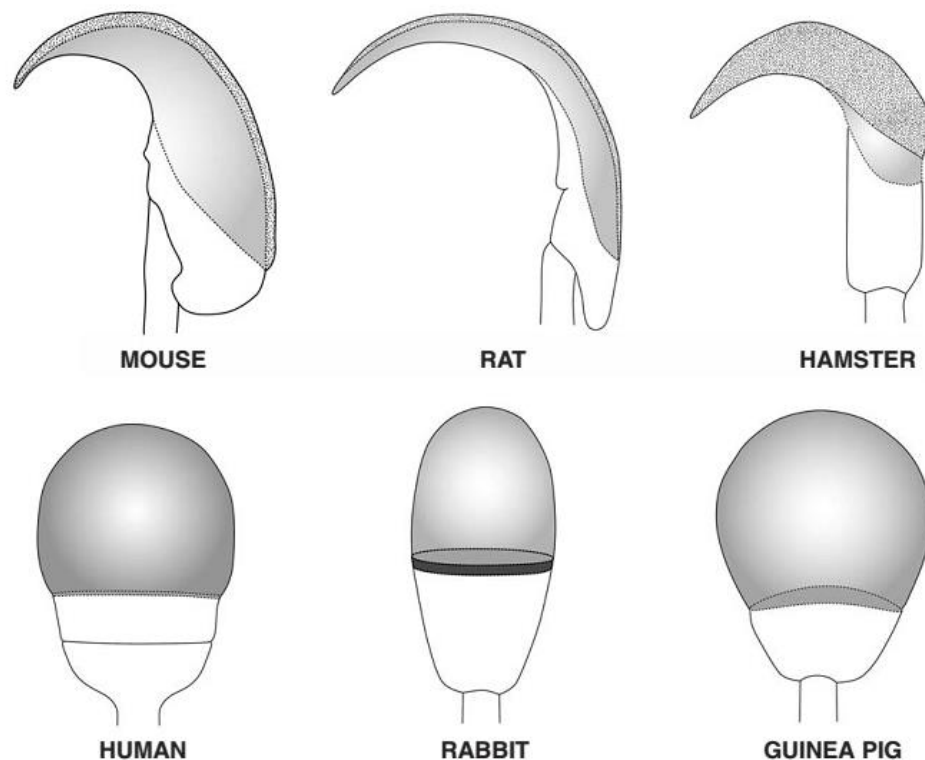
3.1 Spermie

Spermie je specializovaná pohlavní buňka, která je charakteristická haploidním počtem chromozomů. Jejím úkolem je aktivně vyhledat a oplodnit vajíčko, a tak zajistit vznik nového jedince (Sharma & Agarwal 2011). Společně se sekrety přídatných pohlavních žláz tvoří ejakulát. Součástí ejakulátu je semenná plazma, která je nezbytná pro ochranu a výživu spermií a jejich deponaci do pohlavního ústrojí samice (Hafez & Hafez 2000).

3.1.1 Morfologická stavba spermie

Spermatická buňka se skládá z hlavičky a bičíku, a je zcela obklopena plazmatickou membránou. Ve své morfologické stavbě však spermie vykazují značné mezidruhové rozdíly. Liší se především tvarem a velikostí hlavičky nebo délkou bičíku (Dvořáková et al. 2005; Gaffney et al. 2011). Celková délka spermie se pohybuje od 50-60 μm u kance přes 60 μm u hřebce, 75-90 μm u býka, 125 μm u myši až po 250 μm u morčete (Cummins & Woodall 1985).

Nejvýraznější mezidruhové rozdíly jsou viditelné ve tvaru hlavičky, tak jak znázorňuje Obrázek 1. Lze rozlišit čtyři základní morfologické typy – kulaté (primáti, člověk), oválné (kanec, býk), falciformní háčkovité (myš) a hlavičky s velkým akrozomem (morče, veverka) (Dvořáková et al. 2005).



Obr. 1: Různé typy hlaviček spermií (Eddy 2006).

3.1.1.1 Hlavička

Hlavička spermií většiny domácích zvířat má zploštělý oválný tvar. Jejím základem je jádro, které zaujímá většinu prostoru hlavičky. Je obalené jadernou membránou a obklopeno malým množstvím cytoplazmy a cytoskeletárních částic (Marvan et al. 1992). Anteriorní část hlavičky je krytá akrozomem a celý povrch obaluje cytoplazmatická membrána. Hlavička spermie je hydrodynamicky uspořádaná, což jí usnadňuje pohyb a její průnik do vajíčka (DeJonge & Barratt 2006).

Pro udržení tvaru hlavičky jsou nezbytné cytoskeletární struktury, které tvoří subakrozomální, postakrozomální a paraakrozomální cytoskelet (Clermont et al. 1955). Mimo tvarování hlavičky plní cytoskelet také funkční úlohu při penetraci spermie do vajíčka (Olson et al. 1983).

Jádro

Jádro je nejvýraznější strukturou hlavičky. Bývá dorzoventrálně zploštělé a odpovídá tvaru hlavičky, který je druhově specifický (Pesch & Bergmann 2006). Je tvořeno kondenzovaným chromatinem, který obsahuje genetickou informaci ve formě DNA, protaminů a histonů (Hafez & Hafez 2000). Protaminy vznikají během spermatogeneze přeměnou histonů. Extrémní kondenzace jaderného chromatinu zajišťuje větší odolnost hlavičky vůči fyzickému zatížení (Chatterjee 2003).

Jádro je ohraničeno dvouvrstvou jadernou membránou, která je charakteristická absencí jaderných pórů. Ochranu tvoří tzv. perinukleární theka, která je tvořena strukturálními bílkoviny a dalšími proteiny, které jsou propojeny disulfidickými můstky. Perinukleární theka se skládá z několika částí, mezi které se řadí subakrozomální vrstva, ekvatoriální segment a postakrozomální plášť. Subakrozomální vrstva se uplatňuje při ukotvení akrozomu. Další dvě jmenované části se účastní vazby při splývání spermie s oocytom (DeJonge & Barratt 2006).

Akrozom

Akrozom je cytoplazmatický útvar, s dvojitou membránou, který svým tvarem připomíná čepičku. Pokrývá apikální část hlavičky spermie a lze ho rozdělit na apikální, hlavní a ekvatoriální segment. Ekvatoriální segment má poloměsíčitý tvar a neobsahuje váčky s enzymy (Johnson et al. 1997). Vnější akrozomální membrána přiléhá k plazmatické membráně v anteriorní části hlavičky. Vnitřní membrána pokrývá 30 až 70 % vnější jaderné membrány (Hightower et al. 1999).

Mezi vnitřní a vnější akrozomální membránou leží akrozomální váček s lytickými enzymy. Ten vzniká fúzí Golgiho aparátu během spermiogenetického vývoje. Akrozomální enzymy, mezi které patří například akrozin a hyaluronidáza, se uvolňují během akrozomální reakce, kdy jsou nezbytné pro penetraci spermie skrz vrstvy *zona pellucida* a *corona radiata* vajíčka (Pesch & Bergman 2006). Funkční akrozom je nezbytný pro oplozovací schopnost spermie. V případě, že by organela byla poškozená nebo úplně chyběla, spermie by nebyla oplození schopná (Berruti & Paiardi 2011).

Postakrozomální čapka

Postakrozomální čapka je rozložena od báze hlavičky až po ekvatoriální segment. Přiléhá těsně k cytoplazmatické membráně. Na rozdíl od akrozomu neobsahuje membrány a je rezistentnější k vnějším vlivům (Gamčík et al. 1992).

3.1.1.2 Bičík

Bičík tvoří nejdelší část spermie. Poskytuje spermii hnací sílu k pohybu a umožňuje jí dopravení do místa oplození v samičím reprodukčním traktu (Berruti & Paiardi 2011). Schopnost pohybu je umožněna specifickým uspořádáním mikrotubulů osového vlákna (Pesch & Bergmann 2006).

Podle charakteristických struktur rozdělujeme bičík do několika oddílů – krček, střední, hlavní a terminální část (DeJonge & Barratt 2006).

Krček

Krček spermie je někdy označován také jako implantační nebo centriolová část bičíku. Tvoří spojení mezi hlavičkou a středním oddílem bičíku. Obvykle dosahuje délky kolem 1 μm (Pesch & Bergmann 2006).

Krček představuje podklad pro další oddíly bičíku. Jeho morfologický základ tvoří segmentované chordy a husté vláknité struktury, které jsou označovány jako kapitulum. V blízkosti kapitula se nachází proximální centriol, který dává vznik segmentovaným i nesegmentovaným chordám. Distální centriol zajišťuje ve fázi rané spermatidy vznik osového vlákna, které tvoří podklad celého bičíku. U zralé spermie se distální centriol vyskytuje již jen ve formě rudimentu (Pesch & Bergmann 2006).

Krček tvoří charakteristicky uspořádaný komplex osových vláken. Středem probíhá dvojice mikrotubulů, která je obklopena dvěma koncentricky uspořádanými kruhy. Vnitřní kruh tvoří devět párů vláken v tzv. dubletech. Jeden z dvojice, označován jako element A, má vláknitý charakter. Druhý z dvojice, element B, je tvořen dutým vláknem. Vlákna vnitřního kruhu jsou označována jako axonema a probíhají celým bičíkem. Vnější kruh tvoří tzv. hladké chordy. Tyto provazce mají podobu devíti plných vláken, které mají hrubou strukturu, které se distálně snižuje až do slepého zakončení (Marvan et al. 1992).

Střední (spojovací) oddíl

Střední oddíl, nazývaný také jako spojovací nebo mitochondriální, je nejsilnější částí bičíku. Navazuje na krček a distálně je ohraničen Jensenovým prstencem, který tvoří rozhraní mezi střední a hlavní částí bičíku spermie (Hafez & Hafez 2000). Prstenec tvoří mechanickou bariéru, jejímž úkolem je zabránit posunu mitochondrií během pohybu bičíku (Pesch & Bergmann 2006).

Pro střední oddíl je typická přítomnost mitochondriální pochvy, která se přikládá přímo na komplex osových vláken. Mitochondrie jsou v ní uspořádané do spirálovité struktury a obalují celý střední oddíl bičíku. Mitochondriální pochva obsahuje enzymy a kofaktory pro tvorbu ATP, které zajišťují energii umožňující pohyb bičíku (De Jonge & Barratt 2006).

Středním oddílem centrálně probíhá axonema, která plní funkci kontraktilního prvku bičíku. Periferně ji obklopují hladké provazce, které se nekontrahují, ale zajišťují tuhost a flexibilitu při pohybu (Johnson et al. 1997).

Hlavní oddíl

Hlavní oddíl je nejdelší částí bičíku, který je anteriorně ohraničen Jensenovým prstencem, a pokračuje skoro až do jeho samotného konce (Pesch & Bergmann 2006). Je pokryt fibrózní pochvou, která udržuje stabilitu kontraktilních prvků bičíku. Nachází se přímo pod plazmatickou membránou (Hafez & Hafez 2000). Struktura hlavního oddílu je podobná struktuře středního oddílu, ale neobsahuje mitochondriální pochvu a je tenčí. Devět hladkých chord se postupně ztenčuje, až nakonec vymizí. V poslední $\frac{1}{4}$ hlavního oddílu se již nachází pouze axonema (Marvan et al. 1992; Hafez & Hafez 2000).

Terminální oddíl

Koncový oddíl bičíku je tvořen pouze osovými vlákny bez pochvy, které na konci ztrácí své charakteristické uspořádání. V proximální části koncového oddílu jsou oba elementy duté, v druhé polovině jedna z dvojice mikrotubulů zaniká. Koncová část se skládá z centrálního páru mikrotubulů, který je obklopený plazmatickou membránou (Hafez & Hafez 2000; Phadke 2008).

3.1.1.3 Plazmatická membrána

Plazmatická membrána pokrývá celou spermii, od hlavičky až po konec bičíku (DeJonge & Barratt 2006). Je složena především z fosfolipidů, cholesterolu a proteinů. Pro plazmatickou membránu je typický amfipatický charakter fosfolipidů, které se skládají do dvojvrstvy tak, aby hydrofilní část směřovala ven do vodného prostředí, zatímco hydrofobní řetězce mastných kyselin míří směrem dovnitř. Součástí membrány je také cholesterol a proteiny, které ovlivňují vlastnosti membrány. Poměr cholesterolu a fosfolipidů ovlivňuje fluiditu membrány. Je citlivá na osmotické změny prostředí. Funkcí membrány je především ochrana buněčného obsahu (Alberts 1998), ale také hraje důležitou roli při procesu kapacitace a interakci s oocyttem (DeJonge & Barratt 2006).

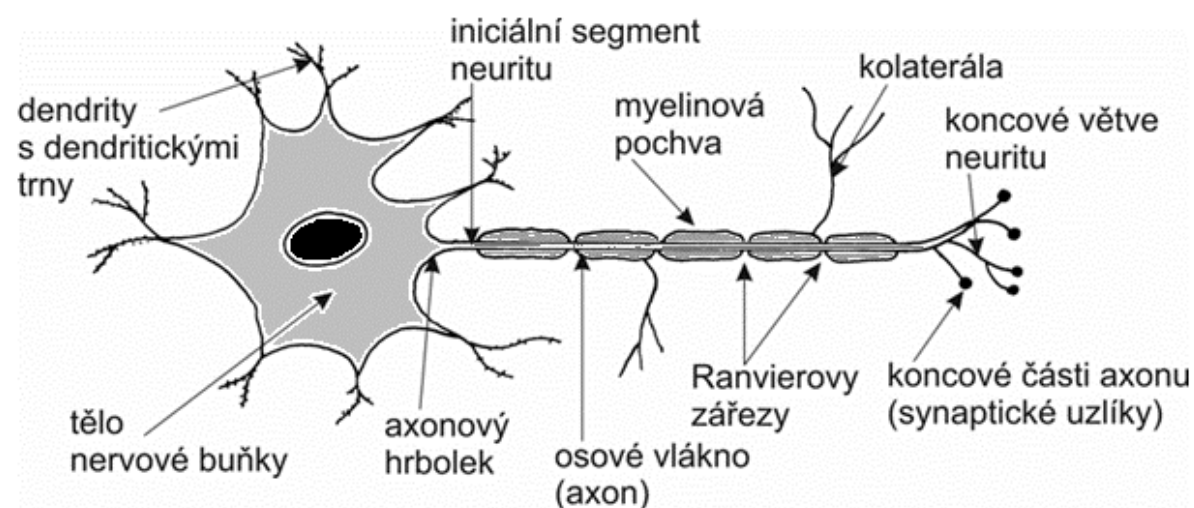
3.2 Hluboké neuronové sítě

Hluboké neuronové sítě jsou fenoménem dnešní doby. Jedná se o nástroje umělé inteligence, které jsou inspirovány fungováním lidského mozku. Stejně jako mozek jsou schopné reagovat na podněty, přijímat, zpracovávat a předávat získané informace a vykonat zadaný úkol. Skládají se z umělých neuronů, které jsou vzájemně propojené podobně jako v biologických nervových strukturách. Stejně jako biologické sítě, i umělé neurony mají schopnost učit se. Hluboké neuronové sítě jsou schopné vyřešit řadu problémů, a tak nachází uplatnění v rozličných oborech.

3.2.1 Biologický neuron

Nervová soustava je komunikační síť, která umožňuje organismu přizpůsobit se změnám vnitřního a vnějšího prostředí. Její základní stavební a funkční jednotkou je nervová buňka neboli neuron. Neurony jsou samostatné buňky specializované na přijímání podnětů, přenos, zpracování a uchování informací ve formě nervových vzruchů (Orel 2015).

Nervová buňka má charakteristickou stavbu, uzpůsobenou pro přenos signálů. Typický biologický neuron se skládá z těla a výběžků – axonu a dendritů (viz Obrázek 2). Tělo, někdy označované jako perikaryon, obsahuje cytoplazmu, orgány a centrálně uložené kulovité jádro s výrazným jadérkem. Z důvodu vysoké energetické náročnosti při vedení vzruchů obsahují neurony také velké množství mitochondrií. Výběžky, které vycházejí z těla neuronu, dělíme na odstředivé a dostředivé (Reece 2011).



Obr. 2: Schéma biologického neuronu (Koňarik 2015).

Odstředivý výběžek, axon neboli neurit, vede nervové vzruchy z těla neuronu ven. Bývá označován jako motorický, protože jeho funkcí je předávat vzruchy, tj. výstupní informace, výkonným strukturám. Na rozdíl od dendritů, axon je na každém neuronu jen jeden. Jeho délka kolísá od několika mikrometrů až po stovky centimetrů (Reece 2011). Ve svém průběhu z neuritu odbočují jen krátké kolmé boční větve. Výrazněji se větví až v terminální části, v místě označovaném jako telodendron, kde se buď stýká s dendrity okolních neuronů, nebo přenáší vzruch na výkonné buňky svaloviny, žláz apod. Na axonu bývá často přítomna

myelinová pochva s tzv. Ranvierovými zářezy, které usnadňují přenos nervového vzruchu (Langmeier & Kittnar 2011).

Dostředivé výběžky, označované jako dendrity, jsou senzitivní, většinou krátká vlákna, která se bohatě dělí v blízkosti těla. Jejich počet a větvení je závislé na funkčních vlastnostech buňky. Dendrity sbírají informace ze senzitivních zakončení (receptorů) nebo okolních neuronů a vedou nervové vzruchy do těla neuronu. Povrch dendritu bývá pokrytý miniaturními výběžky, tzv. dendritickými trny, které slouží k předávání vzruchů (Marvan et al. 1992).

Podle počtu výběžků, které vybíhají z těla neuronu, lze neurony morfologicky klasifikovat. Většina neuronů v centrální nervové soustavě je multipolárního charakteru. To znamená, že mají jeden axon a několik rozvětvených dendritů. Méně častým typem jsou bipolární neurony, které mají pouze jeden axon a jeden dendrit. Bipolární neurony se objevují v oční sítnici, čichové sliznici a nosní dutině. Ojedinele se vyskytují neurony unipolární (pouze axon) a pseudopolární, u kterých axon v blízkosti těla zdánlivě splývá s dendritem a působí jako jeden výběžek (Orel 2015).

Místa spojení mezi neurony se nazývají synapse. V synapsích nedochází k fyzickému kontaktu neuronů, ale nachází se zde synaptická štěrbin, ve které dochází k přenosu nervových vzruchů prostřednictvím chemických látek, tzv. neurotransmiterů. K přenosu informací na synapsích dojde pouze, pokud je elektrický signál dostatečně silný, aby dosáhl prahové hodnoty aktivační energie. Charakteristickou vlastností synapsí je schopnost vedení signálu pouze v jednom směru (Fraser 1998).

3.2.2 Formální neuron

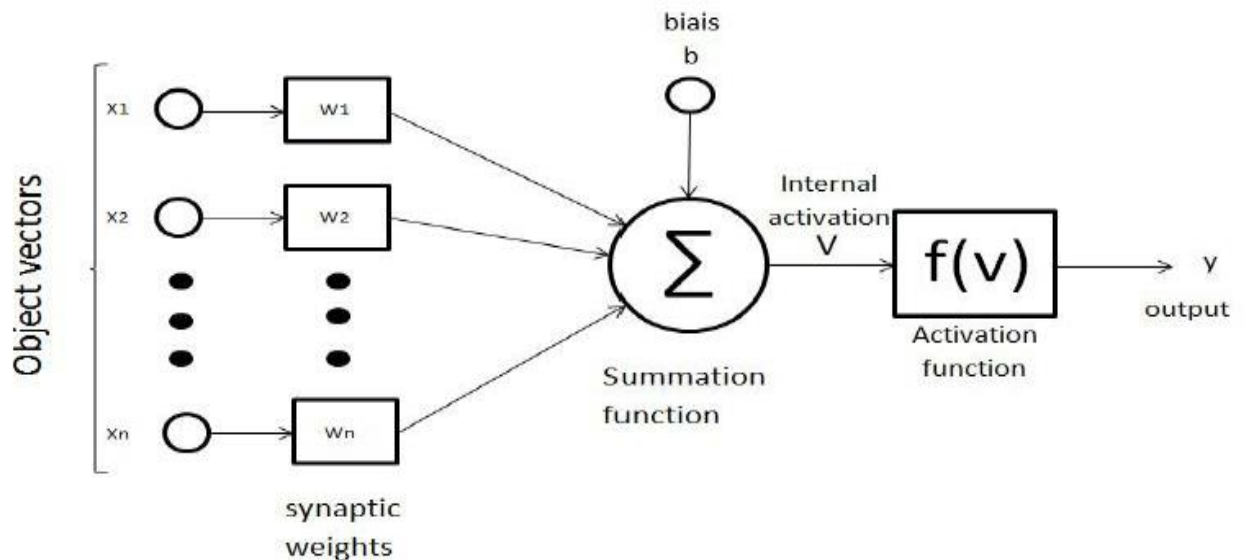
Umělé neboli formální neurony jsou základem matematického modelu neuronové sítě. Jsou inspirovány stavbou a fungováním biologických neuronů (viz Obrázek 3). Formální neuron má obvykle několik reálných vstupů $x = (x_1 \text{ až } x_n)$, které jsou napojené na jádro neuronu. Váha tohoto připojení je charakterizována vektorem $w = (w_1 \text{ až } w_n)$. Váhový vektor může nabývat kladných nebo záporných hodnot, které simulují excitační nebo inhibiční charakter synaptických vah, a můžou se během procesu učení měnit. Výstup neuronu bývá značen písmenem y (Volná 2008).

$$y_{in} = \sum_{i=1}^n w_i x_i$$

Obr. 3: Zjednodušený vzorec formálního neuronu Y . Vážená suma vstupních hodnot y_{in} představuje vnitřní potenciál neuronu Y (Volná 2008).

Do neuronových sítí může být začleněn také bias (b), který slouží jako práh pro aktivační funkce. Znárodnuje se vždy jako aktivní, tj. nabývá hodnoty $x_0 = 1$ a je včleněn k vektoru x , tak že $x = (1, x_1, x_2, \dots, x_n)$. Bias je dále zpracováván jako jakýkoliv jiný váhový vektor $w_0 = b$. Dosazením výsledné hodnoty do aktivační (přenosové) funkce získáme konečný výstup z neuronu (Volná 2008). Schéma formálního neuronu znázorňuje Obrázek 4.

Nejjednodušší aktivační funkcí je funkce binární, kdy na výstupu můžeme získat pouze hodnotu 0 („off“), pokud je hodnota nižší než prahová hodnota, nebo 1 („on“), pokud je hodnota vyšší nebo rovna prahové hodnotě. Častěji se však používají funkce sigmoidální, ReLU (*Rectified Linear Unit*), nebo hyperbolický tangens, protože je lze lehce zderivovat, což zkracuje dobu učení sítě (Anderson & McNeill 1992).



Obr. 4: Schéma formálního neuronu (Atibi et al. 2014)

3.2.3 Neuronová síť

Každá neuronová síť se skládá z umělých neuronů, které jsou vzájemně propojeny tak, že výstup jednoho neuronu je zároveň vstupem do dalších neuronů, stejně tak, jako jsou axony biologického neuronu přes synapse spojeny s dendrity jiných neuronů (Volná 2008).

3.2.3.1 Architektura neuronové sítě

Spojováním umělých neuronů můžeme vytvořit nejrůznější typy neuronových sítí, které se hodí pro různé a specifické typy úloh. Vzájemné propojení neuronů je určeno architekturou neuronové sítě (Šíma & Neruda 1996). Každá vrstva může mít n počet neuronů (Kröse & Van der Smagt 1993). Obecně platí, že čím větší a složitější je architektura sítě, tím lepších výsledků síť dosahuje, ale její trénování je náročnější (Kriesel 2007).

U vícevrstvých neuronových sítí rozlišujeme vstupní (*input layer*), skryté (*hidden layers*) a výstupní (*output layer*) vrstvy neuronů. Jako skryté bývají označovány všechny vrstvy, které se nachází mezi vstupní a výstupní vrstvou (Šíma & Neruda 1996).

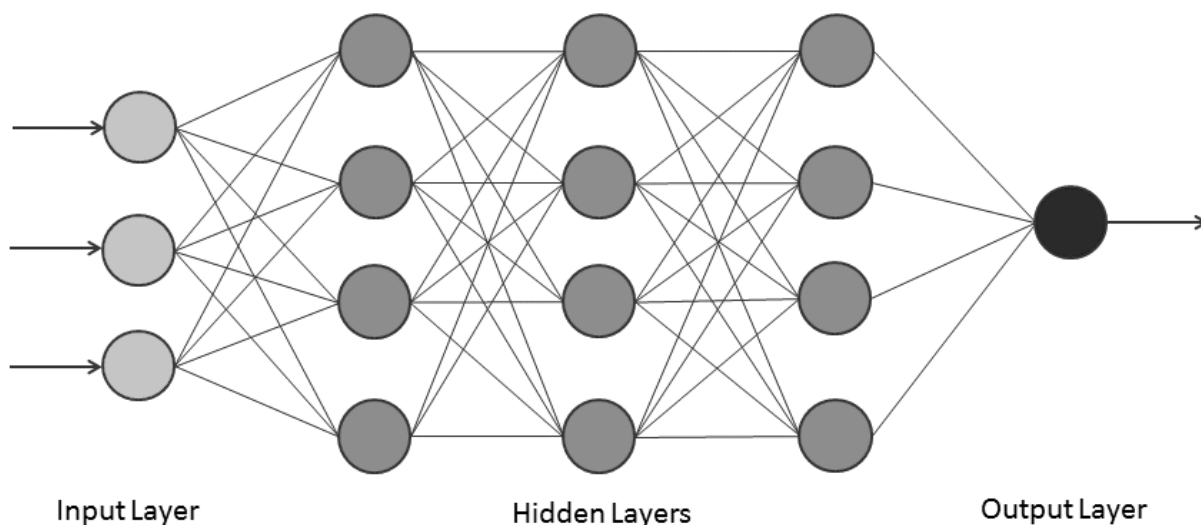
Spoje mezi jednotlivými vrstvami jsou charakterizovány váhovými vektory (w), které ovlivňují sílu vlivu předchozích neuronů na neurony v následující vrstvě. Stav každého neuronu v síti je dán mírou aktivace, která je spočítána na základě výstupů neuronů z předchozí vrstvy. Celková míra aktivace je opět váhována a odeslána do následující vrstvy. Tímto způsobem se signál šíří od vstupní vrstvy až do výstupní, kde dochází k reakci na podnět ze vstupní vrstvy (Kriesel 2007).

3.2.3.2 Perceptron

Perceptron je nejjednodušším modelem dopředné neuronové sítě, který byl navržen v roce 1957 Frankem Rosenblattem. Typický perceptron má n vstupů (x_1, x_2, \dots, x_n), které jsou všechny napojeny na jeden neuron. Každému spojení je přiřazena váhová hodnota w (Hagan 1996). Přenášený signál je buď binární (hodnota 0 nebo 1), nebo bipolární (hodnota -1, 0 nebo 1). Perceptron má jen omezené možnosti využití, protože je možné jej použít pouze pro řešení problémů s lineárně separovatelnými množinami (Volná 2008).

3.2.3.3 Feed-forward síť

Nejrozšířenější architekturou jsou takzvané *feed-forward* neboli dopředné sítě. Pro dopředné sítě je charakteristické uspořádání neuronů do jednotlivých vrstev – jedné vstupní, několika skrytých a jedné výstupní. Neurony z nižší vrstvy jsou vždy napojeny na neurony z vyšší vrstvy, tedy platí, že výstupy nižší vrstvy jsou využívány jako vstupy následující vrstvy (viz Obrázek 5). Pokud jsou takto navzájem propojeny všechny neurony z jedné vrstvy se všemi neurony následující vrstvy, označujeme síť jako zcela propojenou (*completely linked*). Feed-forward sítě se obvykle využívají k rozpoznávání obrazu (Kriesel 2007). Klasickým příkladem dopředné sítě může být například perceptron (Kröse & Van der Smagt 1993).



Obr. 5: Schématické znázornění dopředné neuronové sítě (Navlani 2019).

3.2.3.4 Vícevrstvý perceptron

Vícevrstvý perceptron je základním typem vícevrstvé sítě. Jedná se o dopřednou neuronovou síť, jejíž základem je perceptron. Mezi dvěma sousedními vrstvami jsou neurony vždy spojeny tak, že výstup každého neuronu jedné vrstvy je spojen se vstupy všech neuronů následující vyšší vrstvy. Tento způsob propojení neuronů umožňuje dopředné šíření signálu. Do sítě je přiveden signál, který způsobí excitaci neuronů ve vstupní vrstvě. Tato excitace je prostřednictvím vazeb přivedena k první skryté vrstvě. Síla signálu bývá upravena pomocí synaptických vah. Od každého neuronu ze vstupní vrstvy se tímto způsobem dostane signál do

všech neuronů v první skryté vrstvě. Tyto kroky se postupně opakují ve všech dalších vrstvách, dokud nezískáme odezvu neuronové sítě na vstupní signál ve výstupní vrstvě (Bengio 2009).

3.2.3.5 Rekurentní síť

Rekurentní neboli cyklické sítě jsou takové neuronové sítě, které obsahují alespoň jednu zpětnou smyčku. Obvykle bývají propojené do kruhu tak, že výstup jednoho neuronu je vstupem následujícího neuronu, jehož výstup je opět vstupem do dalšího neuronu, až k poslednímu neuronu z této skupiny, jehož výstup je vstupem prvního neuronu (Volná 2018). Obvykle tak není možné přesně definovat vstupní, ani výstupní neurony. Neurony v cyklické síti se mohou navzájem ovlivňovat. Jsou schopné si zapamatovat informace na delší dobu, ale obtížněji se učí. Nejčastěji se využívají při modelování sekvenčních dat a při predikci časových řad (Kröse & Van der Smagt 1993).

3.2.4 Učení neuronových sítí

Nejvýznamnější vlastností neuronových sítí je jejich schopnost učit se. V biologických sítích jsou zkušenosti uloženy v neuronových výběžcích, dendritech. Podobně je tomu tak i u umělých sítí, kde se zkušenosti ukládají v synaptických váhách, které reprezentují spojení mezi neurony (Haykin 2015).

Aby se neuronová síť mohla učit, je potřeba jí poskytnout dostatečné množství trénovacích dat. Rozdíly v jednotlivých informacích jsou způsobeny rozdílnými hodnotami váhových vektorů, proto se síť učí tak, že se jí upravují jednotlivé parametry vah a biasu u aktivační funkce (Bengio 2009; Nielsen 2018).

Cílem učících algoritmů je nastavit vektory synaptických vah tak, aby se minimalizovala chybovost sítě. V ideálním případě se po každém dalším učícím procesu výsledky sítě zlepšují (Haykin 2015).

Existují několik způsobů učení neuronových sítí.

3.2.4.1 Korelační (Hebbovo) učení

Korelační učení využívá principu tzv. Hebbova učení. Hebbovo učení je založeno na myšlence, že váhové hodnoty na spojení mezi dvěma neurony, které jsou současně ve stavu „on“, budou narůstat, a naopak pokud jsou váhové hodnoty na spojení mezi dvěma neurony současně ve stavu „off“, váhové hodnoty se budou snižovat. Změna synaptické váhy spoje mezi dvěma neurony je úměrná jejich souhlasné aktivitě, tj. součinu jejich stavů. Donald Hebb tímto způsobem vysvětloval vznik podmíněných reflexů. Hebbova učení však lze využít pouze v jednovrstvých sítích, ve kterých jsou všechny vstupní neurony propojeny s jediným výstupem Y , ne však již navzájem mezi sebou (Volná 2008).

3.2.4.2 Adaptační učení

Při adaptačním učení se váhy upravují všem neuronům. Lze ho rozdělit na učení bez učitele a s učitelem.

Při adaptačním učení bez učitele (*unsupervised learning*) neposkytujeme síti žádný očekávaný výstup, tj. nemá žádné vnější kritérium pro určení správnosti výsledku. Síti je

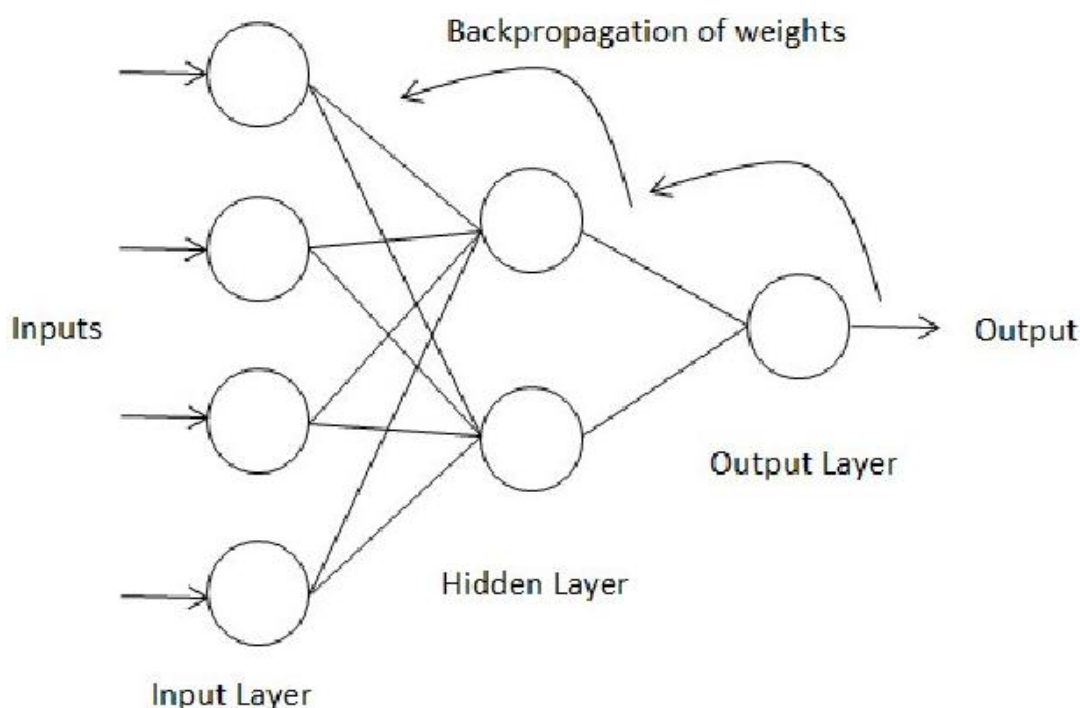
poskytnuta pouze trénovací množina dat, která obsahuje vstupní hodnoty. Síť si následně sama data roztrídí na základě různých společných vlastností, které si v nich najde (Kriesel 2007).

Při učení s učitelem (*supervised learning*) poskytujeme síti při učení soubor vstupních dat i s očekávaným výstupem, tj. síť dostane vzor, jak by měl vypadat výsledek. Podobně jako v biologických sítích, i umělá síť při učení využívá zpětné vazby. Výstup sítě je porovnáván s očekávaným výstupem a na základě toho je vypočítána chyba sítě. Na základě toho se upravují hodnoty vah tak, aby byly výsledky v další fázi učení přesnější. Pro výpočet korekce se využívají nejrůznější algoritmy, mezi které patří například backpropagation (Kriesel 2007).

3.2.4.3 Backpropagation

Backpropagation je adaptační algoritmus zpětného šíření chyby, který se používá především ve vícevrstvých dopředných sítích. Lze ho použít pouze v případě, kdy je k dispozici množina trénovacích dat a jedná se o učení s učitelem, tj. vstupní data musí být popsána požadovaným výstupem. Proces backpropagation probíhá ve třech krocích – dopředné šíření vstupního signálu tréninkových dat, zpětné šíření chyby a adaptace hodnot synaptických vah (viz Obrázek 6). Tyto kroky se opakují tak dlouho, dokud není chyba sítě tak malá, že ji lze považovat za naučenou (Volná 2008).

Hlavním cílem backpropagation je minimalizovat chybovost sítě, kterou zjistíme při porovnání výsledků z výstupu s požadovanými výsledky, které byly předloženy síti na začátku (Gerhenson 2013). Neuronové sítě bývají na začátku učícího procesu obvykle vysoce chybové. Proto je algoritmus backpropagation velmi důležitý, protože informuje síť o tom, zda někde udělala chybu. Během backpropagation se postupuje opačným směrem než při dopředném šíření signálu, tj. od výstupu ke vstupu. Algoritmus během zpětného průchodu sítě upravuje synaptické váhy neuronů tak, aby měla síť co nejlepší výsledky (Nielsen 2018).



Obr. 6: Schématické znázornění backpropagation (Hassim & Ghazali 2012).

3.2.5 Hluboké neuronové sítě a jejich učení

Jako hlubokou neuronovou síť lze označit vícevrstvou síť, která obsahuje více než tři skryté vrstvy. Některé hluboké sítě mohou obsahovat až 150 skrytých vrstev (MathWorks 2019). Hluboké neuronové sítě nacházejí uplatnění při identifikaci objektů, rozpoznávání písmen, číslic, obličejů, porozumění řeči, při řízení autonomních automobilů, a začínají se objevovat také v medicíně, např. při rekonstrukci mozkových tkání, predikci nemocí apod. Především při rozpoznávání objektů bývají hluboké neuronové sítě efektivnější, než klasické neuronové sítě (LeCun et al. 2015).

Hluboké neuronové sítě se učí tzv. *deep learningem* (hluboké učení), které napodobuje způsob, kterým se učí lidský mozek. Hluboké učení je úspěšné především při zpracování velkoobjemových dat (MathWorks 2019). V moderních hlubokých sítích je nejpoužívanější aktivační funkcí ReLU (*Rectified Linear Unit*), která umožňuje zachování konstantního gradientu i při vysokých vstupních hodnotách x (Wan et al. 2013). V porovnání se sigmoidními či podobnými funkcemi, ReLU dosahuje rychlejšího a efektivnějšího trénování sítí i na velkých objemech dat (LeCun et al. 2015).

Při učení hlubokých neuronových sítí se obvykle využívá algoritmu backpropagation (LeCun et al. 2015). Z důvodu velkého množství skrytých vrstev však může u hlubokých sítí dojít k problému při zpětné propagaci chyby z důvodu mizejícího gradientu. Čím více skrytých vrstev síť obsahuje, tím horší je signál v nižších vrstvách blízko vstupní vrstvy, a tak jsou tyto neurony při backpropagation modifikovány jen minimálně. Řešením tohoto problému je tzv. chytré předtrénování sítě. Jednotlivé vrstvy se nejprve učí odděleně bez učitele a tím získají skryté vrstvy představu o tom, co se mají učit. Poté se síť spojí dohromady a finální učení již probíhá klasicky metodou backpropagation (Materna 2013).

Nejtypičtějším příkladem hluboké neuronové sítě je síť konvoluční (Wan et al. 2013).

3.2.5.1 Konvoluční neuronové sítě

Konvoluční neuronové sítě (CNN, z angl. *convolutional neural network*), jsou dopředné vícevrstvé sítě. Lze je popsat jako nástroj počítačového vidění. Používají se pro rozeznávání objektů, osob na ulici, dopravních značek, překlad textu v reálném čase, v oblasti bezpečnosti, lékařské diagnostiky, u autonomních aut a dalších (LeCun et al. 2015).

Konvoluční sítě mají svou charakteristickou architekturu. Většinou mají několik konvolučních vrstev, na které navazují vrstvy poolingové. Poslední část tvoří plně propojená neuronová síť, která dále zpracovává informace a tvoří výstup sítě (Wan et al. 2013). Na vstupní vrstvu konvoluční sítě je zaslán digitální obraz, který je složen ze tří dvoudimenzálních polí, která reprezentují jednotlivé barevné kanály (red, green, blue) a obsahují informace o intenzitě barev v každém pixelu (LeCun et al. 2015). Takový vstup lze přirovnat k sítnici oka, která obraz převede na signál, který vede do mozku (Wan et al. 2013).

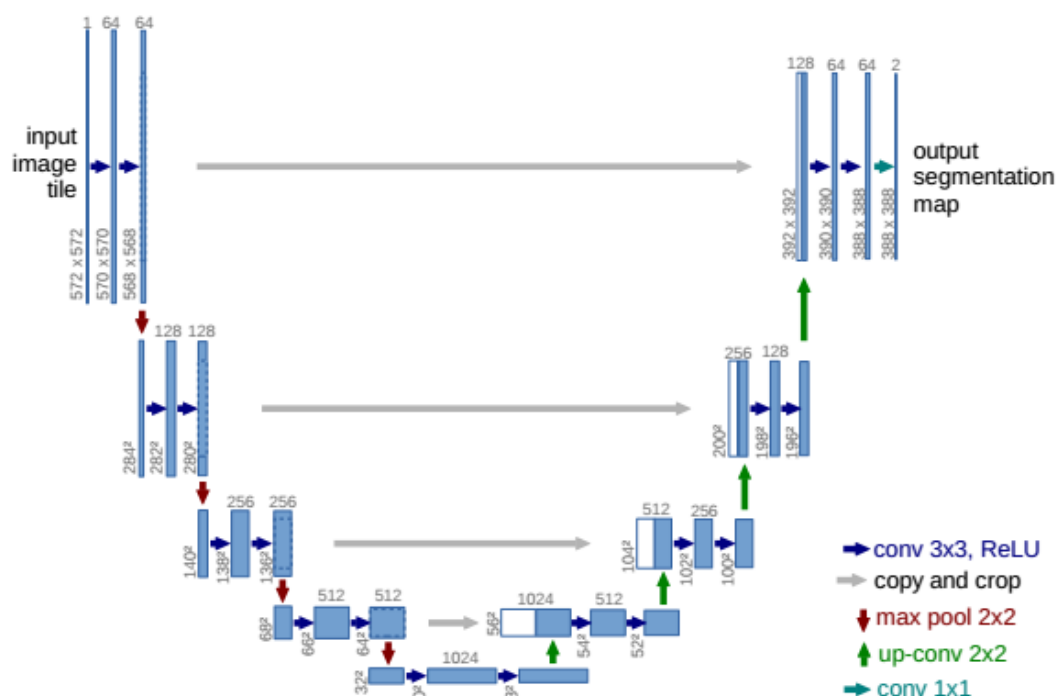
Nejnižší konvoluční vrstva detekuje jednoduché tvary, jako jsou například přímky, hrany objektů apod. Vyšší vrstvy pak různě kombinují základní tvary, a tím se učí detekovat složitější objekty (Wan et al. 2013). Čím více vrstev, tím složitější tvary se síť může naučit rozpoznávat (Krizhevsky et al. 2012). Na konvoluční vrstvu navazuje poolingová vrstva, která má za úkol snížit citlivost výstupu na deformace či otočení obrazu (Wan et al. 2013). To znamená, že pokud lehce pozměníme vstup, výstup poolingů zůstane stejný (Goodfellow et al. 2016). Poslední

vrstva, tzv. klasifikační, je tvořena plně propojenou vícevrstvou neuronovou sítí (LeCun et al. 2015).

3.2.5.2 U-Net

Neuronová síť implementovaná do CASA softwaru NIS-Elements je označována jako plně konvoluční. Jedná se o síť typu U-Net, která byla vyvinuta týmem Ronneberger et al. (2015) na univerzitě ve Freiburgu (Německo) pro biomedicínskou obrazovou segmentaci (např. zobrazení struktur neuronů při EMG vyšetření, detekce tumorů apod.).

Název U-Net vychází z architektury této sítě, která připomíná tvar písmene U (viz Obrázek 7). Architektura sítě je symetrická a skládá se ze dvou částí. V levé části se nachází tzv. kontraktlní vrstvy, v pravé části se nachází expanzivní vrstvy (Ronneberger et al. 2015).



Obr. 7: Architektura plně konvoluční neuronové sítě U-Net, která je, mimo jiné, implementována i do softwaru NIS-Elements (Ronneberger et al. 2015).

Kontraktlní část, někdy nazývaná také jako enkodér, má typickou strukturu konvoluční sítě, která sestává z opakovaných konvolučních vrstev s aktivační funkcí ReLU (*Rectified Linear Unit*) a max-poolingových vrstev (Ronneberger et al. 2015). Úkolem max-poolingových vrstev je vybrat pouze nejrelevantnější informace (pixely o maximální hodnotě), a méně důležité informace (pixely nižší hodnoty) vyřadit. Tento proces označovaný jako „*down sampling*“ snižuje hodnoty vzorkovací frekvence, tj. zajišťuje zmenšení velikosti obrazu, respektive jeho rozlišení (např. 4x4 → 2x2). Po procesu „*down sampling*“ v pooling vrstvě následuje další konvoluční vrstva, která pokračuje ve zpracování obrazu. Prostřednictvím „*down sampling*“ se postupně redukuje velikost obrazu, což umožňuje hlubším vrstvám enkodéru vnímat obraz v širším kontextu. Zároveň se však v každém kroku zdvojnásobuje

množství zdrojových kanálů pro daný obraz, což napomáhá zisku komplexních dat z daného vstupu (Lamba 2019).

Expanzivní část, symetrická k enkodéru, bývá nazývána také jako dekodér. Díky její unikátní architektuře bývá síť U-Net označována jako plně konvoluční, protože od vstupu do výstupu obsahuje pouze kombinaci konvolučních a max-poolingových vrstev. Klasifikační neboli plně propojená „*dense*“ vrstva, která je typická pro konvoluční síť, u U-Net chybí. Díky tomuto uspořádání může U-Net analyzovat obraz jakékoliv velikosti. Dekodér umožňuje přesnou lokalizaci objektu (Lamba 2019). Stejně jako v enkodéru, i v dekodéru jsou konvoluční vrstvy regulovány aktivační funkcí ReLU (Ronneberger et al. 2015).

V klasických konvolučních sítích s pooling vrstvami, se informace, které poolingové vrstvy redukuje, vytrácí. V případě obrazové segmentace je však nezbytné tyto informace zachovat. Z tohoto důvodu je potřeba po konvoluci v enkodéru, konvertovat obraz s nízkým rozlišením opět do vyššího rozlišení. Tento proces bývá označován jako „*up sampling*“ neboli přenesená konvoluce či dekonvoluce. Dekonvoluce probíhá opačně než běžná konvoluce. Během každého kroku se zvyšuje vzorkovací frekvence zdrojové mapy a množství zdrojových kanálů se snižuje na polovinu. Po dekonvoluci je původní vstup (*input*) ve formě obrazu s nízkým rozlišením převeden na výstup (*output*) s vysokým rozlišením (Lamba 2019).

Celkem obsahuje síť U-Net 23 konvolučních vrstev. Její architektura je modifikována tak, že k natrénování sítě stačí jen pár desítek tréninkových souborů (Ronneberger et al. 2015). U-Net klasifikuje každý pixel na vstupu (*input*) i výstupu (*output*) ve stejných rozměrech, čímž získává schopnost lokalizovat a rozlišit hranice objektů (Zhang 2019).

Většina U-Net sítí je implementována ve struktuře, která odpovídá schématu sítě v příloze 1 (Zhang 2019), v příloze 2 je uveden celý zdrojový kód konvoluční sítě U-Net (Hönigschmid 2018).

3.3 CASA – počítačem řízená analýza spermií

Počítačem řízená analýza spermií, známá pod zkratkou CASA, pochází z anglického *computer assisted sperm analysis* nebo *computer-aided sperm analysis*. První primitivní CASA systém byl představen již v roce 1974 a umožňoval analýzu méně než 30 spermatických buněk na 4-8 snímcích. O několik let později byl vyvinut první plně automatický CASA software „CellSoft Automated Semen Analyser“, který byl zpřístupněn pro komerční využití v roce 1985 (Mortimer et al. 2015). Krátce poté následovaly například softwary Hamilton-Thorn HTM-2000, Strömberg-Mika Cell Motion Analyser, Hobson Sperm Tracker, Cell Track System, Sperm Vision a další (Rijsselaere et al. 2012). V roce 1992 umožnili vývojáři Sperm Motility Quantifier (SMQ) jako první provádět rutinní analýzy při snímací frekvenci 50 Hz (Mortimer et al. 2015).

Pojmem CASA se rozumí počítačové vyhodnocení digitálních snímků prostřednictvím specializovaného softwaru, který je schopen tyto snímky analyzovat. CASA představuje praktický nástroj, který poskytuje rychlé a objektivní posouzení rozličných charakteristik spermatických buněk. Navíc dokáže podat přesné informace i o koncentraci ejakulátu, pohyblivosti, viabilitě, morfologických abnormalitách spermií a vypracovat základní statistické analýzy (Lu et al. 2014).

Moderní CASA systémy jsou schopny analyzovat 500-2000 spermií s rychlostí 50-60 snímků za sekundu, a za méně než 2 minuty dokážou zpracovat informaci z více než 30 snímků a vypracovat individuální analýzu pro každou spermii z hodnoceného ejakulátu (Amann & Waberski 2014). Právě schopnost CASA softwaru analyzovat během chvíle tisíce spermií je pro praxi velmi užitečná. Proto jsou CASA systémy v dnešní době běžně užívané ve vědeckých laboratořích a stále častěji nacházejí uplatnění také v inseminačních stanicích a centrech asistované reprodukce. Používají se mimo posouzení kvality ejakulátu k predikci fertilizačních schopností spermií, k diagnostice funkčních abnormalit u pacientů s idiopatickou infertilitou nebo v oblasti reprodukční toxikologie (Verstegen et al. 2002).

V roce 2014 uváděli ve své práci Amann & Waberski, že je po celém světě zaznamenáno 12 různých komerčních CASA systémů, užívaných pro analýzu zvířecích ejakulátů. Každý však pracuje na lehce odlišném principu. Vykazují velké rozdíly především v použité optice a využívaných algoritmech pro identifikaci spermií a rekonstrukce trajektorií (Verstegen et al. 2002). Některé CASA mají zabudovaný LED nebo xenonový blesk, což umožňuje fluorescenční zobrazování. Po expozici spermií fluorochromem dokáže takový systém identifikovat intaktní plazmatickou membránu, a tak rozlišit živé a neživé spermií, a především lépe odlišit spermií od cizích objektů (Mortimer et al. 2015).

3.3.1 Princip fungování CASA

Základními prvky CASA je počítačový software a optický systém, který zahrnuje mikroskop s negativním fázovým kontrastem, výhřevnou destičku a videokameru s vysokým rozlišením a zobrazovacím digitizérem (Rijsselaere et al. 2012). Většina CASA systémů je založena na podobném principu, ale liší se v použité optice, hardwarovém a softwarovém příslušenství (Verstegen et al. 2002).

Princip CASA spočívá v nasnímání vzorku spermií videokamerou a převedení mikroskopického obrazu do digitální formy (viz Obrázek 8). Získaná data jsou následně zpracována softwarem, který umožňuje rekonstruovat trajektorie podle pozice hlavičky a analyzovat pohyb spermií. Výstupem analýzy je výčet jednotlivých spermií, obecná data jako celková a progresivní motilita, a výsledky vybraných kinematických parametrů (Lu et al. 2014).

3.3.1.1 Identifikace spermií

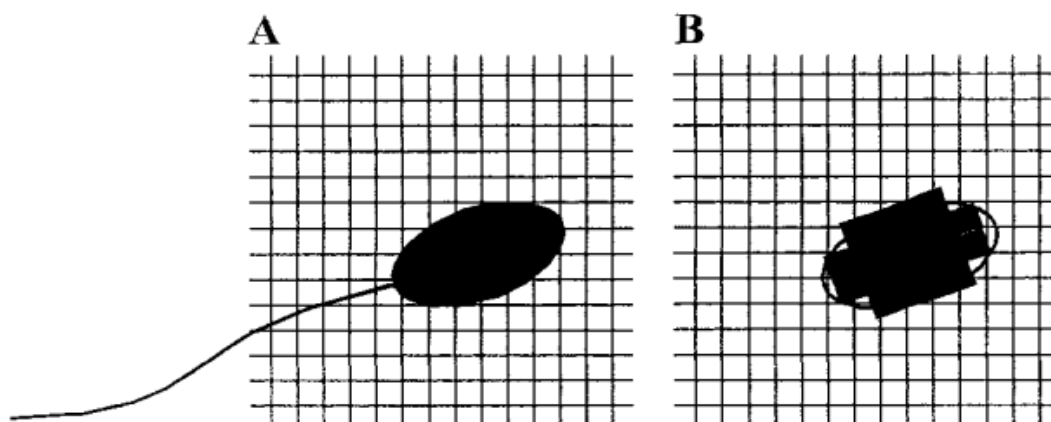
Většina CASA softwarů vyhodnocuje pohyb spermie v reálném čase podle pohybu hlavičky. Proto je pro vypracování analýzy nezbytné správně identifikovat hlavičku spermie (Mortimer 1997).

V první řadě je obraz z mikroskopu snímán kamerou a konvertován v digitální obraz. Nejčastěji se využívá mikroskopů s negativním fázovým kontrastem, což umožňuje projekci bílých spermií na tmavém pozadí. Spermie jsou tak dobře viditelné, a i za pohybu zůstává světlost obrazu konstantní a nemění se intenzita bílé (Mortimer 2000). Kamera využívaná ke snímání mikroskopických obrázků musí mít schopnost vysokofrekvenčního snímání. Počet snímků, které je kamera schopna zaznamenat závisí na použitém obrazovém standardu. Obvykle bývají používány standardy PAL (*phase alternative line*) nebo NTSC (*National Television Standards Committee*). Pro oba zmíněné standardy platí, že kamera nahrává ve dvou polích. První pole je složeno z lichých řádků a druhé pole je tvořeno ze sudých řádků. Zkombinováním těchto dvou polí vzniká videosnímek. PAL systém umožňuje 25 snímků, resp. 50 polí, za sekundu, zatímco NTSC standardy zvládají 30 snímků, resp. 60 polí, za sekundu. V minulosti se běžná doba snímání pohybovala mezi 0,25 až 0,5 sekundy, ale v dnešní době je již možné spermie sledovat i delší dobu. Použité standardy mají vliv na počet snímků, ze kterých je analyzována trajektorie spermie a mohou ovlivnit výpočet hodnot kinematických parametrů (Mortimer & Swan 1999).

Aby byla spermie identifikována jako spermie, její obraz musí vyhovovat předem zadaným parametrům, jako je například minimální a maximální délka a šířka, počet pixelů, prahový jas (*threshold brightness*) a další (Mortimer 1997). Tyto parametry bývají uživatelsky nastavitelné a mění se například v závislosti na živočišném druhu. U některých systémů se však vyskytuje problém při chybné identifikaci cizích objektů, které splňují parametry nastavené pro hlavičky spermií (Mortimer 2000). Alternativní řešení tohoto problému nabízí např. software Stromberg-Mika Cell Motility Analyser, který detekuje spermie rekognicí hlaviček i s bičíky (Neuwinger et al. 1990). Jiné řešení nabízí např. Hamilton Thorne systém, který využívá svůj tzv. IDENT systém, kdy je fluorescenčně detekováno jádro hlavičky s DNA (Zinaman et al. 1996).

Jakmile je hlavička identifikována, software vypočítá její polohu na souřadnicích x a y . Tento bod $[x; y]$ je používán pro další analýzy jako těžiště hlavičky (Mortimer 2000). Některé softwary, např. CellSoft, detekují spermie jako sousedící řady pixelů a následně určí střed této skupiny pixelů, označovaný jako centroid (Berns & Berns 1982). Oproti tomu např. CellTrack systém (*MotionAnalysis*) využívá detekce hran, přičemž jsou definovány pouze pixely, které jsou vymezené perimetrem. Objekt je následně digitalizován a centroid je dopočítán (Boyers et al. 1989). Jiné systémy využívají jako referenční bod nejjasnější pixel na hlavičce spermie (Mortimer 2000). V softwaru NIS-Elements se centroid počítá jako vážený průměr jednotlivých

bodů objektu, které jsou vážené intenzitou jasu v daném bodě. Algoritmus pro výpočet centroidu je stejný pro nižší verze NIS-Elements, i pro pokročilejší verze s umělou inteligencí (Kuderjavý 2020).



Obr. 8: Znázornění snímku hlavičky spermie (obrázek A) a obrazu spermatické hlavičky v pixelech (obrázek B), tak jak ji „vidí“ počítač po digitalizaci (Mortimer 2000).

3.3.1.2 Rekonstrukce trajektorií

Ve chvíli, kdy jsou určeny referenční body všech hlaviček na snímku, může být zahájena analýza dalších snímků vedoucí k rekonstrukci trajektorie spermie. Počítač začne vyhledávat na následujícím snímku hlavičku v zóně pravděpodobného výskytu, kterou si lze představit jako kruhovitý prostor kolem hlavičky spermie. Rádus je definován jako prostor kolem hlavičky spermie na aktuálním snímku, ve kterém se bude hledat poloha hlavičky na snímku nadcházejícím. Tento prostor je určen maximální vzdáleností, kterou je spermie schopná pravděpodobně urazit za daný čas. Velikost rádia je uživatelsky nastavitelná a obvykle se liší podle použitého ředidla a živočišného druhu ejakulátu. Když je dokončeno určování souřadnic polohy na aktuálním snímku, stejným způsobem jsou vyhodnoceny i všechny následující, dokud není daná sekvence kompletně hotová. Každá spermie má na každém snímku určen svůj referenční bod a podle něj je rekonstruována trajektorie a vypočítány pohybové parametry (Mortimer 2000). Průběh rekonstrukce trajektorie je znázorněn na Obrázku 9.

Trajektorie dané spermie je zaznamenána softwarem, matematicky zpracována a následně jsou výsledky vybraných parametrů předloženy v číselné podobě (Quintero-Moreno et al. 2003)



Obr. 9: Znázornění průběhu rekonstrukce trajektorie. Na základě sledování referenčního bodu (centroid) v sekvenci snímků, dokáže software zrekonstruovat trajektorii dané spermie (Mortimer 2000).

3.3.2 Porovnání mezi CASA a manuální analýzou

Manuální hodnocení ejakulátu je velmi subjektivní a je ovlivněno především zkušenostmi laboratorních pracovníků. Iquer-Ouada & Verstegen (2001) uvádí, že při subjektivním hodnocení pod světelným mikroskopem bývá variabilita výsledků měření u téhož

vzorku ejakulátu zhruba 30-60 %. Aby se eliminoval vliv hodnotící osoby a předešlo se nepřesnostem v měření, začaly se hledat jiné metody, které by vzorky analyzovaly objektivněji. Výsledkem bylo vyvinutí počítačem řízené analýzy spermií – CASA. Gillian et al. (2008) uvádí, že korelace mezi subjektivním hodnocením a hodnocením prostřednictvím CASA je vysoká ($r=0,76$). Garrett et al. (2003) uvádí, že ve výpočtu koncentrace ejakulátu, se výsledky CASA a manuálního hodnocení výrazně neliší, zatímco v hodnocení motility jsou patrné signifikantní rozdíly.

Bylo provedeno také několik studií (Jin et al. 2004; Ge et al. 2008; Akashi et al. 2010), které porovnávají výsledky analýz z různých CASA softwarů. Autoři se shodují, že výsledky hodnocení koncentrace, motility a rychlosti jsou porovnatelné, ale objevují se zásadní rozdíly v parametrech ALH a BCF, jejichž hodnoty jsou závislé na zvoleném algoritmu daného softwaru.

Výrazně se liší také výsledky CASA systémů, které využívají fluorescenčního značení spermií, což umožňuje rozlišení živých a mrtvých spermií a také lepší rozlišení spermatických buněk od jiných částic přítomných v ejakulátu. U nefluorescenčních CASA systémů existuje vysoké riziko chybného označení buňky, která není spermie, nebo naopak neoznačení některých hůře detekovatelných spermií (Lu et al. 2014).

3.3.3 Výhody a nevýhody CASA

Největší výhodou CASA metody je její objektivita a eliminace lidského faktoru při hodnocení vzorků. Systém nabízí rychlé hodnocení a možnost opakovaného měření. Umožňuje jak sledování jednotlivých spermií, tak celku. Mezi výhody patří i možnost standardizace a uživatelského nastavení parametrů pro konkrétní analýzu (Verstegen et al. 2002). Umožňuje nastavení frekvence snímání od 15, přes 30, 60, 90 Hz až po 250 Hz (Bompart et al. 2019), a také počet analyzovaných snímků, ze kterých je vypočítána trajektorie spermie a analyzovány její pohybové vlastnosti. Uživatel si může nastavit také hodnoty, které zlepšují rozlišení hlaviček spermií od jiných buněk přítomných ve vzorku – např. intenzita, velikost objektu apod. (Verstegen et al. 2002).

Mezi nevýhody CASA se řadí vysoké pořizovací náklady, nutnost standardizace postupu a optimalizace zařízení (Verstegen et al. 2002). Ve veterinární andrologii je nutné zohlednit mezidruhové rozdíly ejakulátu, jako je například různý objem a koncentrace, morfologie i rozdílné pohybové charakteristiky. To vyžaduje správné nastavení parametrů, které se u jednotlivých CASA softwarů mohou lišit. Nastavit správné parametry a stanovit přesnou standardizaci získaných hodnot pro motilitu a rychlost spermií u jednotlivých druhů však není snadné (Rijsselaere et al. 2012). I přes automatický software a snahu o minimalizaci lidského faktoru, je pro věrohodné výsledky analýz z CASA třeba dbát na proškolenost a zkušenosti laboratorních techniků (Feitsma et al. 2011).

CASA systémy umožňují vysokou úroveň spolehlivosti a přesnosti, a tak jsou výborným nástrojem pro objektivní analýzu. Jejich velkým nedostatkem je však nemožnost porovnání výsledků z různých CASA softwarů. Mezi jednotlivými CASA softwary neexistuje jednotná standardizace, ani optimalizace nastavení a liší se i používané algoritmy, metody identifikace spermií i rekonstrukce trajektorií (Kathiravan et al. 2011; Lu et al. 2014). Rozličné CASA

systemy vykazují vysokou variabilitu ve výsledcích analýz, a tak nelze jednoznačně porovnávat výsledky z různých studií (Verstegen et al. 2002).

3.3.4 Limitující faktory a zdroje chyb v CASA

I přes snahu o co nejobektivnější hodnocení, existuje mnoho faktorů, které mohou ovlivnit výsledky měření a hodnocení pomocí CASA softwaru. Mezi ně patří například způsob zpracování ejakulátu a přípravy vzorku, koncentrace a objem vzorku, příměsi ve vzorku, použitá ředidla, stav ejakulátu (čerstvý či rozmražený), teplota a osmotické změny, typ a hloubka počítací komůrky, kontrast, snímková frekvence, algoritmy, model a verze softwaru, použitý mikroskop, optické přístroje a další (Amann & Waberski 2014). Postupy manipulace s ejakulátem a CASA zařízením nejsou nikde jasně stanoveny, a tak je nezbytné, aby byly ve všech studiích přesně popsány podmínky a nastavení za kterých analýza proběhla (Verstegen et al. 2002).

Využití CASA v medicíně limitují technické faktory, které jsou spojeny s analýzou digitálních obrazů a zásadně odlišným přístupem k definování motility. Manuálně bývá v laboratořích motilita často hodnocena podle pohybu bičíku, zatímco většina CASA systémů při analýze motility vychází z trajektorie hlavičky. V tomto případě je však možné, že systém vyhodnotí některé objekty, většinou příměsi ředidla a nečistoty, na základě Brownova pohybu chybně jako motilní spermie. Proto je velmi obtížné na základě pohybu hlavičky určit robustní definici pro neprogresivně motilní spermie (Mortimer et al. 2015).

3.3.4.1 Lidský faktor

I přesto, že CASA eliminuje subjektivní vliv člověka na výsledky analýzy, lidský faktor přetrvává při přípravě vzorků. Světová zdravotnická organizace (WHO 2010) proto vydala manuál, který prezentuje standardizované postupy analýzy. Manuál je doplněn instruktážním DVD s podrobnými detaily, aby se předešlo nedorozumění a chybné interpretaci textu. Při dodržování postupů z WHO manuálu by se mělo snížit riziko výskytu chybných výsledků v důsledku špatné přípravy vzorku. K tomu je nezbytné také odpovídající proškolení laboratorního personálu (Brazil 2010).

Lu et al. (2014) upozorňuje, že pro spolehlivé používání CASA je nezbytné provádět pravidelné kontroly kvality osob používající CASA, a měla by se podporovat snaha o standardizaci CASA systémů. Mnoho laboratoří však stále využívá své subjektivní techniky, což znemožňuje porovnání výsledků analýz z různých studií.

3.3.4.2 Teplota

Teplota zkoumaného vzorku je jeden z nejdůležitějších faktorů, které ovlivňují motilitu spermií. Teplota výrazně zkresluje výsledky, a tak bylo provedeno velké množství studií, které se zaměřovaly na stanovení optimální teploty pro analýzu ejakulátu jednotlivých živočišných druhů (Verstegen et al. 2002). Ve studii prováděné Iguer-Ouada & Verstegen (2001) byly porovnávány výsledky hodnocení ejakulátu psů při teplotě 30 °C, což odpovídá teplotě semene po ejakulaci, a 38 °C, což je hodnota odpovídající tělesné teplotě psa. Ze studie vyplynulo, že pro posuzování motility psiho ejakulátu je optimální teplota 38 °C.

3.3.4.3 Počítací komůrka

Dalším faktorem, který ovlivňuje výsledky hodnocení, je kvalita/typ počítací komůrky a počet snímaných polí. Při použití počítacích komůrek typu Makler nebo SpermTrack stoupá riziko chybných výsledků při jejich opakovaném používání a nedokonalém vyčištění (Verstegen et al. 2002). Cai et al. (2009) ve své studii porovnával výsledky měření z různých typů počítacích komůrek (Makler, Leja a *MicroCell*). Při porovnání výsledků stejného vzorku analyzovaného v těchto třech komůrkách se prokázal signifikantní rozdíl v naměřených koncentracích i motilitě spermií.

Motilitu spermií ovlivňuje především hloubka komůrky, a tak může nesprávně zvolená velikost komůrky znehodnotit výsledky měření. Obvyklá hloubka se pohybuje mezi 10 μm a 50 μm (Verstegen et al. 2002). Bompert et al. (2018) uvádí jako nejčastěji užívanou hloubku 10 μm (*Makler* komůrka) u analýzy lidského ejakulátu, zatímco u většiny domácích zvířat považuje za optimum 20 μm (*Leja* komůrka).

Lu et al. (2014) upozorňuje, že při použití hlubších komůrek nastává problém při zobrazování spermií v CASA, protože se vzrůstající hloubkou komůrky se zvyšuje množství spermií pohybujících se v různých hloubkách, což zhoršuje ostrost nasnímaných objektů. Proto je doporučováno používání komůrek s obvyklou hloubkou 10-20 μm , protože u nich téměř nedochází k pohybu spermií směrem nahoru či dolů mimo hloubku ostrosti mikroskopu. Na druhou stranu, zejména pro spermie některých živočišných druhů, takto hluboké komůrky znamenají omezení v podobě nedostatečného prostoru pro jejich přirozený způsob pohybu. Rikmenspoel (1965) udává, že býčí spermie potřebují prostor minimálně 12 μm na každou stranu. Nedostatečný prostor mění rychlost a charakteristické vzorce pohybu, protože spermie mají tendence přilnout k povrchu komůrky. V každém případě platí, že spermie se pohybují jinak v omezeném prostoru komůrky, než ve volném prostoru (Amann & Waberski 2014).

3.3.4.4 Osvětlení, optické systémy a počet sledovaných polí

Výrobci optických systémů poskytují rozsáhlý výběr osvětlení od širokého barevného spektra (390-700 nm; maximální vizuální citlivost je udávána při 500 nm) až po úzkopásmové osvětlení s použitím filtrů či speciálních LED diod. Často se objevují systémy využívající ultrafialové záření (kolem 343 nm), které umožňuje excitaci fluorochromu (např. barvivo Hoechst 33342 s vazebnou afinitou k DNA). Méně častěji systémy nabízí infračervené záření (kolem 880 nm). Některé systémy používají „pulsující“ osvětlení. Přerušované svícení se používá z důvodu snížení množství dopadajícího světla na závěrku optického systému, nebo také pro redukci doby expozice spermií škodlivému ultrafialovému záření (Amann & Waberski 2014).

V laboratořích bývají používané konvenční optické systémy od standardních dodavatelů. Pro analýzu motility se běžně využívá objektivů s negativním (nebo pozitivním) fázovým kontrastem s uzavřeným kondenzátorem. Při analýze spermií v problematických médiích, jako je např. homogenizované mléko nebo vaječný žloutek, lze využít nástavců pro detekci spermií po expozici fluorochromem. Barvení různými fluorochromy umožňuje detekci spermií s poškozenou membránou, abnormálním akrozomem a další (Amann & Waberski 2014).

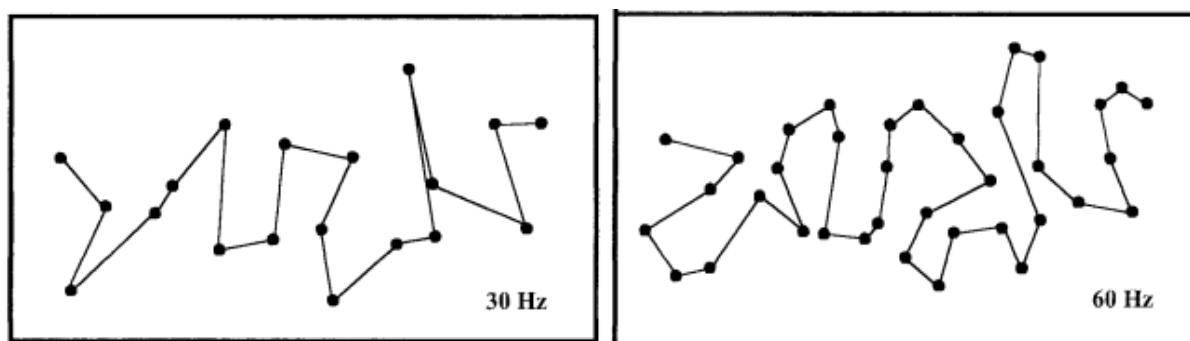
Obecně platí, že se vzrůstajícím počtem sledovaných polí, klesá variační koeficient, čímž stoupá důvěryhodnost a přesnost měření. Budworth et al. (1987) uvádí, že pro přesné výsledky je doporučeno sledování alespoň 300 spermii v minimálně 30 polích. Pro hřebce se zdá optimální analýza 300-500 spermatických buněk (Varner et al. 1991). Za minimální hranici bývá považováno 100 spermii (Verstegen et al. 2002, Feitsma et al. 2011).

3.3.4.5 Prahování (*threshold*)

Pro validní výsledky je nezbytné použít vhodný optický systém a vhodně zvolit hladinu osvětlení pro zvýšení kontrastu hlaviček spermii. Prahové hodnoty je možné v CASA systémech nastavit manuálně. Kraemer et al. (1998) však upozorňuje, že právě manuální prahování je kritickým bodem analýzy, a proto se zvyšuje snaha o zdokonalení funkce automatického prahování.

3.3.4.6 Frekvence snímání (*frame rate*)

Frekvence snímání udává počet snímků, které zaznamenává optický systém za sekundu. Snímací frekvence je závislá na kvalitě vidokamery a použitém standardu snímání (Mortimer 2000). Snímací frekvence má přímý efekt na trajektorie spermii, což může ovlivnit výsledky hodnocených pohybových parametrů. Obecně platí, čím vyšší je hodnota snímací frekvence, tím detailněji je trajektorie zrekonstruována. V případě, že je trajektorie rekonstruována při frekvenci 30 Hz, není příliš členitá, zatímco při 60 Hz je trajektorie komplexnější (viz Obrázek 10). Obvyklé nastavení snímkové frekvence se pohybuje mezi 30 a 60 Hz, ale v některých novějších systémech jsou dostupné i frekvence 90-250 Hz (Bompart et al. 2019). Owen & Katz (1993) uvádí jako nejuniverzálnější hodnotu snímací frekvence pro většinu savců 60 Hz.



Obr. 10: Stejná trajektorie zaznamenána při různých snímacích frekvencích (30 a 60 Hz). Se zvyšující se frekvencí se zvyšuje množství dostupných detailů o trajektorii. Takto rozdílné množství informací o trajektorii ovlivňuje většinu kinematických parametrů (Mortimer 2000).

Kromě snímkové frekvence, je zásadní také maximální rychlost spermie. Je-li nastavená maximální rychlost příliš nízká, může dojít chybnému spojení bodů trajektorie různých spermii. Naopak, je-li nastavená maximální rychlost příliš vysoká, některé buňky nemusí být správně posouzeny a nemusí dojít k zaznamenání trajektorie (Verstegen et al. 2002). Kraemer et al. (1998) navrhuje, že pro lidské spermie s maximální rychlostí 400 $\mu\text{m/s}$ je optimální frekvence snímání 30 Hz.

Nejcitlivějším parametrem na nastavenou frekvenci snímání je křivočará rychlost (VCL), zatímco přímočarou rychlost (VSL) ovlivňuje nejméně, protože je sestavena jako přímka prvního a posledního bodu trajektorie za dobu měření (Bompart et al. 2018).

Castellini et al. (2011) ve své studii porovnává hodnoty různých kinematických parametrů v závislosti na frekvenci snímání. Jak je signifikantní z Tabulky 1, nejvíce byly hodnotou snímací frekvence ovlivněny parametry VCL, kde se hodnoty zvýšily čtyřnásobně, a BCF, kde uvádí více než desetinásobné zvýšení hodnot.

Tab. 1: Efekt snímací frekvence na vybrané parametry spermií – VCL (*curvilinear velocity*) a BCF (*beat-cross frequency*) (Castellini et al. 2011, upraveno).

Frekvence snímání (Hz)	12	25	50	100	200
VCL ($\mu\text{m/s}$)	58,5	88,1	156,7	206,8	217,2
BCF (n)	2,6	6,1	15,2	23,5	29,6

3.3.4.7 Algoritmy

Algoritmus je přesný postup, kterým lze vyřešit daný typ úlohy. Popisuje, jak transformovat vstupní údaje na výstupní za přesně stanovených podmínek (Čápka 2016). Lessner (2017) uvádí, že správně nastavený algoritmus musí splňovat následující vlastnosti:

- 1) Rezultativnost, tj. algoritmus vždy vydá nějaký výsledek.
- 2) Finitnost, tj. algoritmus skončí po konečném počtu provedených kroků.
- 3) Elementárnost popisu, tj. algoritmus je popsán konečným počtem jasně definovaných základních instrukcí.
- 4) Determinovanost, tj. postup práce je jasně daný a vždy závisí pouze na popisu algoritmu a jeho vstupu. Na průběh algoritmu nemá žádný vliv náhoda nebo svobodná vůle vykonavatele (Lessner 2017). Jednoznačnost algoritmů má zcela zásadní důsledek – pro stejný vstup vydá algoritmus vždy stejný výstup, bez ohledu na okolní podmínky. Díky tomu mohou být algoritmy spolehlivě využívány automatickými systémy (Čápka 2016).

Přesto, že se CASA systémy používají již mnoho let a většina jich je založena na podobném principu, stále neexistuje jednotná standardizace (Chang et al. 2017). Rozdíly mezi CASA systémy spočívají, mimo jiné, v různých specifických algoritmech pro identifikaci hlaviček, resp. polohu jejich centroidu, rekonstrukce trajektorií a výpočet souvisejících kinematických parametrů (Holt et al. 2007; Contri et al. 2010).

Právě rozdílné algoritmy jsou největšími překážkami pro zcela objektivní hodnocení a porovnatelnost výsledků mezi laboratořemi (Amann & Waberski 2014; Lu et al. 2014). Je důležité počítat s tím, že identifikace hlaviček pro rekonstrukce trajektorií je relativní (Mortimer 1997). Algoritmy jednotlivých softwarů obvykle nejsou veřejně dostupné, což ještě více omezuje možnost porovnávání výsledků (Vested et al. 2011).

I přesto, že se použité algoritmy napříč různými CASA systémy různí, základní obecné principy pro rekonstrukce trajektorií bývají podobné. Prvním krokem bývá nalezení pozice centroidu a odhad místa pravděpodobnosti výskytu v nadcházejících snímcích. Druhým krokem algoritmu bývá odhad počtu centroidů, které jsou k dispozici k analýze a rekonstrukci trajektorií, v nejkratším možném čase. Třetím krokem bývá specifikace minimálního počtu snímků, na kterých se centroid musí vyskytovat, aby byla spermie považována za motilní. Ve finální fázi algoritmus obvykle specifikuje počet snímků, ve kterých má hledat dráhu dané spermie. Tímto je ukončena rekonstrukce trajektorií a algoritmus může pokračovat s výpočtem kinematických parametrů (Kathiravan et al. 2011).

Mezi nejvíce citlivé parametry na použité algoritmy patří ALH a BCF (Boryshpolets et al. 2013; Bompert et al. 2018). Amann & Waberski (2014) uvádí, že v důsledku využívání proprietárních softwarů, které využívají rozličné algoritmy, se největší rozdíly objevují ve výpočtu parametru BCF.

Mortimer & Swan (1999) uvádí, že hodnoty pohybových parametrů, jako jsou VAP a ALH, jsou vypočítány po vyhlazení trajektorie spermií, a tak jsou snadno ovlivnitelné vyhlazovacími algoritmy. To má za následek ovlivnění výpočtu průměrné dráhy a přidružených kinematických parametrů. To znamená, že pro stejnou trajektorii lze při hodnocení různými CASA systémy získat velice rozdílné výsledky kinematických parametrů (Mortimer 2000).

Douglas-Hamilton et al. (2005) uvádí, že kromě přesnosti výpočtů kinematických parametrů, ovlivňuje rozdílnost algoritmů také řešení kolizí. Způsob řešení kolizí pomocí korekčních algoritmů je zcela zásadní pro správný výpočet koncentrace spermií (Bompert et al. 2018; Valverde et al. 2019).

V důsledku rozdílnosti algoritmů a nemožnosti porovnávat výsledky kinematických parametrů z různých softwarů je obtížné vytvořit standardy pro plemeníky a stanovit optimální hodnoty ejakulátu. Plné využití CASA výstupů v oblasti predikce fertilizačního potenciálu je tak značně limitované (Lu et al. 2014).

3.3.4.8 Koncentrace ejakulátu

Koncentrace ejakulátu bývá významným faktorem ovlivňující CASA analýzu. Jak čerstvý, tak i kryokonzervovaný ejakulát bývá pro úspěšnou analýzu a určení trajektorií příliš koncentrovaný, a tak je nezbytné jej před analýzou naředit na vhodnou koncentraci (Verstegen et al. 2002).

Optimální hodnota koncentrace se však u jednotlivých autorů liší. Mortimer (2000) doporučuje koncentraci nižší než $40 \times 10^6/\text{ml}$. Verstegen et al. (2002) ve svém textu uvádí jako vhodnou koncentraci pro CASA analýzu $30\text{-}50 \times 10^6/\text{ml}$. Světová zdravotnická organizace (WHO, 2010) ve svém manuálu doporučuje pro CASA analýzy používat koncentrace nižší než $50 \times 10^6/\text{ml}$. Contri et al. (2010) ve své studii uvádí, že nižší koncentrace umožňují správné provedení analýzy, zatímco koncentrace vyšší než $50 \times 10^6/\text{ml}$ limitují schopnost CASA systému správně rekonstruovat trajektorie a provést úspěšnou analýzu. Při vysokých koncentracích se zvyšuje riziko chybných výsledků v důsledku častějšího křížení trajektorií a vzájemných kolizí spermií (Mortimer 2000).

Velká pozornost by měla být věnována také výběru vhodného ředidla. U některých ředidel (např. žloutkové) se může stát, že bude obsahovat částice, které lze chybně zaměnit za

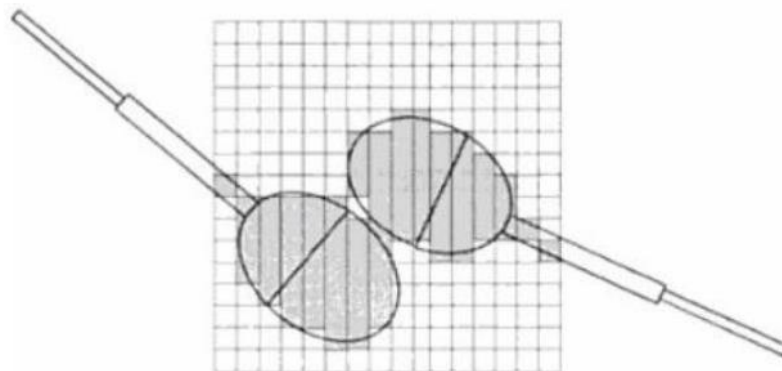
hlavičky pozorovaných spermií (Verstegen et al. 2002). Navíc v každém ředidle spermie reagují jinak, především vzhledem k odlišnému extracelulárnímu prostředí, než v semenné plazmě při průchodu samičím reprodukčním traktem (Amann & Waberski 2014).

3.3.4.9 Identifikace spermií a rekonstrukce trajektorií

Při obrazové analýze se často objevují problémy vyplývající z chyb při rozlišování mezi spermii a cizími objekty (příměsi ředidla, fragmenty buněk, nečistoty atd.). Dalšími problematickými aspekty je rozlišování mezi pohyblivými a nepohyblivými objekty, a rekonstrukce trajektorií. Komplikované jsou především vzorky s příliš vysokou koncentrací a velkým množstvím shloučených či aglutinovaných spermií (Mortimer 1997).

Příměsi se ve vzorcích vyskytují relativně často a mohou tak výrazně ovlivnit výsledky analýzy. Především CASA systémy využívající negativní fázový kontrast nebo tmavý světelný podklad, často chybně identifikují nespermatické částice. Identifikace nespermatických částic, jako spermií, uměle navyšuje celkový počet spermií nacházející se v zorném poli (Mortimer et al. 2015). Pokusem o vyřešení tohoto problému bylo použití fluorescenčních markerů. To však neřeší problém s aglutinovanými spermii, kdy software nedokáže rozeznat jednotlivé hlavičky (Mortimer 1997).

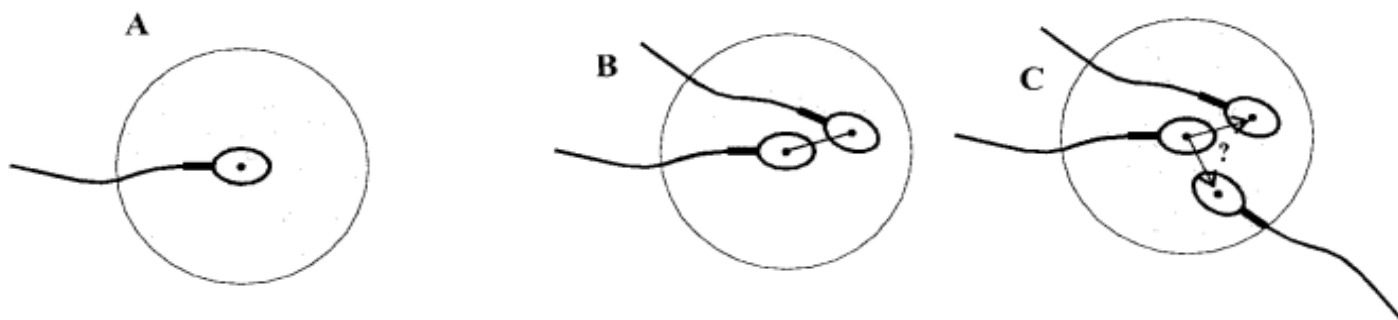
V případě že se dvě a více spermií vyskytují příliš blízko u sebe (viz Obrázek 11), nebo poblíž jiných objektů, systém je často identifikuje jako jeden velký spojený objekt, který vyhodnotí jako příliš velký na to, aby ho klasifikoval jako hlavičku spermie, a proto je vyřadí z analýzy. V důsledku vyřazení těchto objektů z analýzy, je zredukována celková koncentrace spermií ve vzorku. Navíc se vyřazením těchto typicky nemotilních spermií, respektive neprogresivně motilních, zvyšuje procento progresivně motilních spermií (Mortimer et al. 2015).



Obr. 11: V případě, že jsou dva objekty v těsné blízkosti, software může mít problém s jejich identifikací (Mortimer 1997).

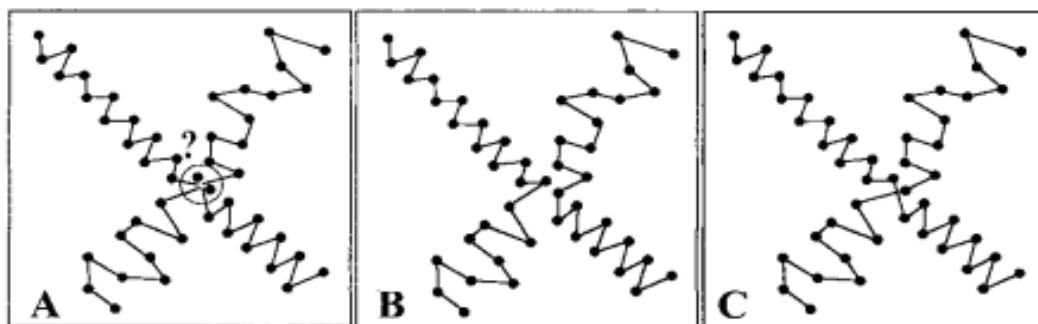
Nemotilní spermie, stejně jako chybně identifikované cizí objekty podobné velikosti, mohou být „strženy“ pohybem bičíku okolních motilních spermií, a tak nesprávně klasifikovány jako motilní. Tato chyba navyšuje zdánlivý počet motilních spermií (Mortimer et al. 2015).

Problematickým bodem jsou také kolize spermií (viz Obrázek 12). Čím vyšší je koncentrace spermií, tím větší je riziko, že se prolnou místa s největším pravděpodobným výskytem (rádius) dvou a více hlaviček, což vede ke vzniku skutečných či zdánlivých kolizí, kdy spermie proplouvá příliš blízko jiného objektu. Některé softwary řeší kolize fragmentací (přerušením) trajektorie a následně takto zkrácený fragment vyloučí z analýzy. Při fragmentaci trajektorie dochází chybně k navýšení koncentrace i procentu progresivně motilních spermií (Mortimer 1997).



Obr. 12: Obrázek A znázorňuje hlavičku spermie s vyznačeným rádiem pravděpodobnosti výskytu hlavičky na následujícím snímku. Pokud se v rádiu na následujícím snímku vyskytuje jen jedna hlavička (obrázek B) je jednoznačně označena jako další bod trajektorie dané spermie. Komplikace nastávají, pokud se v místě předpokládaného výskytu hlavičky objeví více spermií, tak jako znázorňuje obrázek C (Mortimer 2000).

V dnešní době již většina CASA softwarů disponuje inteligentními korekčními algoritmy pro kolize, tzv. „*smart collision correcting algorithms*“, které nabízí alternativní přístup pro řešení kolizí. Software sleduje obě spermie ze vzniklé kolize a následně dojde ke znovupropojení trajektorií v místě kolize. Ukázalo se však, že tento přístup může vést k signifikantním chybám ve výpočtu pohybových charakteristik, pokud dojde k propojení dvou chybných fragmentů (Mortimer et al. 2015), viz Obrázek 13. Ve všech verzích softwaru NIS-Elements je pro tracking zvolen motion model *Constant Speed*. Algoritmus NIS-Elements tak při rekonstrukci trajektorií po kolizi vždy preferuje objekt, který nejvíce odpovídá dosavadnímu vývoji trajektorie (Chudý 2020).



Obr. 13: V důsledku kolizí nebo přílišné blízkosti několika objektů, resp. výskytu dalších objektů v rádiu dané spermie (viz obr. A), může dojít k chybné rekonstrukci trajektorie, tak jako znázorňuje obrázek B. Na obrázku C je znázorněna správně zrekonstruovaná trajektorie (Mortimer 2000).

3.3.5 Parametry motility v CASA

CASA umožňuje prostřednictvím algoritmů vyhodnotit kinematické a rychlostní parametry spermií. Kinematické parametry popisují směr a způsob pohybu hlavičky spermie. Rychlostní parametry analyzují rychlost pohybu spermie (Quintero-Moreno et al. 2003).

U každého vzorku lze programem obvykle vyhodnotit následující parametry – počet buněk, koncentrace spermií, celková motilita, progresivní motilita, přímočará rychlost, křivočará rychlost, průměrná rychlost. Dále lze zjistit amplitudu laterálního vybočení hlavičky spermie, frekvenci křížení a další (Kathiravan et al. 2011).

3.3.5.1 Celková motilita (TMOT) a progresivní motilita (PMOT)

Celková motilita, udává procento pohyblivých spermií z celkového počtu (Alquézar-Baeta et al. 2019). Motilita je jedním z nejdůležitějších ukazatelů kvality ejakulátu, protože právě schopnost pohybu hraje důležitou roli při průchodu samičím reprodukčním traktem a oplození vajíčka (Quintero-Moreno et al. 2004).

Progresivní motilita udává procento progresivně pohyblivých spermií z celkového počtu (Alquézar-Baeta et al. 2019).

Pro popis rychlosti pohybu spermie, která je určována dle polohy hlavičky, se používají tři základní parametry – VSL, VCL a VAP, viz Obrázek 14. Každý z těchto rychlostních parametrů popisuje různé aspekty progresivního pohybu spermie (Mortimer 1997).

3.3.5.2 Přímočará rychlost (VSL)

Označení VSL, z anglického *velocity straight line*, je používáno pro přímočarou, jinak také lineární, rychlost. Přímočará rychlost představuje vzdálenost mezi prvním a posledním bodem trajektorie spermie za určitý čas. Hodnota VSL udává rychlost spermie po napřímené dráze v jednotkách $\mu\text{m/s}$ (Mortimer 1997).

3.3.5.3 Křivočará rychlost (VCL)

Křivočará rychlost, z anglického *curvilinear velocity* je definována jako rychlost spermie po skutečné dráze v jednotkách $\mu\text{m/s}$. Jedná se o dvoudimenzionální projekci skutečné trojrozměrné trajektorie pohybu spermie. Parametr VCL měří vzdálenost mezi jednotlivými body skutečné trajektorie spermie. Všechny úseky následně sečte, a tak se vypočítá celková vzdálenost, kterou spermie urazila za určitý čas (Mortimer 1997).

De Geyter et al. (1998) ve své studii pozoroval souvislost mezi křivočarou rychlostí VCL a fertilizačním potenciálem spermií. Uvádí, že spermie s vyšší naměřenou křivočarou rychlostí, vykazovali vyšší úspěšnost oplodnění oocytů při inseminaci. Kathiravan et al. (2011) v souvislosti s fertilizačním potenciálem spermií uvádí, že při hodnotě VCL $>70 \mu\text{m/s}$, spolu s parametrem ALH $>7 \mu\text{m}$ a sníženou linearitou, lze spermie označit jako hyperaktivované.

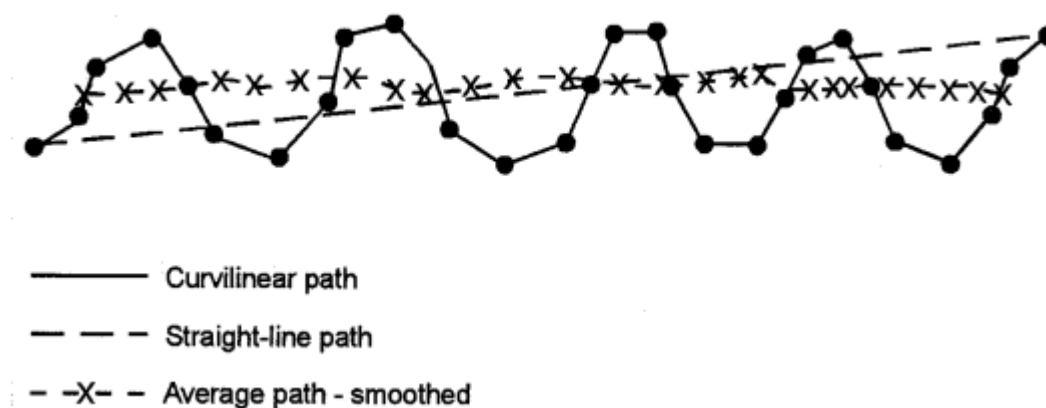
3.3.5.4 Střední dráhová rychlost (VAP)

Parametr VAP, z angl. *velocity average pathway*, je definována jako rychlost spermie po průměrné dráze. Hodnota VAP se, stejně jako VSL a VCL, udává v jednotkách $\mu\text{m/s}$ (Mortimer 1997).

Průměrná dráha může být odvozena různými způsoby, např. vizuální interpolací různých matematických vyhlazovacích technik nebo geometrickou konstrukcí (Björndahl et al. 2010). Z důvodu rozdílných algoritmů v různých CASA systémech, však nemůže být hodnota VAP porovnávána s výsledky z jiných softwarů (World Health Organization 2010). VAP parametr navíc významně ovlivňuje další odvozené parametry, jako je např. STR, WOB, ALH či BCF (Lu et al. 2014).

Lu et al. (2014) uvádí, že v případě, že se spermie pohybuje pravidelně hodnota VAP je téměř identická s hodnotou VSL. Avšak v případě, že by se hlavička spermie pohybovala nepravidelně, hodnota VAP by byla mnohem vyšší než VSL.

Contri et al. (2010) ve své studii rozděluje spermie podle hodnoty VAP na rychlé ($VAP > 80 \mu\text{m/s}$), středně rychlé ($80 \mu\text{m/s} > VAP > 25 \mu\text{m/s}$), pomalé ($< 25 \mu\text{m/s}$) a statické ($VAP = 0$).



Obr. 14: Grafické znázornění kinematických parametrů popisujících trajektorii spermie, dle polohy hlavičky (Mortimer 1997).

3.3.5.5 Odvozené parametry

Z výše uvedených základních parametrů VSL, VCL a VAP lze vypočítat další parametry. Jedná se o průměrné hodnoty a poměry těchto parametrů, které bývají vyjádřeny v celočíselných procentech. Mezi tyto se řadí například parametry přímosti, linearity a frekvence pohybu bičíku (Mortimer 1990).

Přímost (STR)

Parametr přímosti STR, z anglického *straightness*, je definován jako podíl rychlosti po napříměné dráze (VSL) a průměrné dráze (VAP) vyjádřený v procentech (Verstegen et al. 2002). STR udává podobnost dráhy spermie ke přímce (Iguer-Ouada & Verstegen 2001).

Linearita (LIN)

Parametr linearity LIN, z anglického *linearity*, je definován jako podíl rychlosti po napřimené (VSL) a skutečné dráze (VCL), uváděný v procentech (Iguer-Ouada & Verstegen 2001). Mortimer (1997) popisuje linearitu jako vyjádření vztahu mezi 2D projekcí a 3D skutečnou cestou, kterou spermie urazí (VCL).

Podle světové zdravotnické organizace (WHO 2010) jsou spermie podle parametrů VCL a LIN klasifikovány do několika stupňů. Spermie s hodnotou VCL >40 $\mu\text{m/s}$ a LIN $\geq 60\%$ jsou klasifikovány jako rychle progresivně motilní. Jako spermie se středně pomalou nebo pomalou motilitou, jsou klasifikovány spermie, které vykazují hodnoty $20 \leq \text{VCL} \leq 40 \mu\text{m/s}$. Spermie s VCL > 40 $\mu\text{m/s}$ a linearitou <60 % jsou označovány jako motilní neprogresivní a spermie s VCL <20 $\mu\text{m/s}$ jsou hodnoceny jako nemotilní.

Wobble koeficient (WOB)

Tento koeficient, označovaný jako kymácivost hlavičky, je definován jako podíl rychlosti po průměrné dráze (VAP) a rychlosti po skutečné dráze (VCL). Je vyjadřován v procentech (Lu et al. 2014).

Amplituda laterálního vybočení hlavičky (ALH)

ALH, z angl. *amplitude of lateral head displacement*, představuje šířku trajektorie hlavičky, tedy odchýlení hlavičky od průměrné dráhy v μm . Hodnota ALH se počítá z amplitud bočních odchylek hlavičky spermie od osy, po které se spermie pohybuje (Martínez-Pastor et al. 2011).

CASA systém uvádí buď průměrnou (ALH_{mean}) či maximální (ALH_{max}) hodnotu amplitudy laterálního vybočení hlavičky. ALH_{max} vyjadřuje maximální hodnotu amplitudy hlavičky od osy během pozorování, zatímco ALH_{mean} vyjadřuje průměrnou hodnotu amplitud za celou dobu měření (Mortimer 2000).

ALH je důležitý parametr pro hodnocení schopnosti spermie projít cervikálním hlenem a fúzovat s vajíčkem. Vypovídá o pohybu bičíku i o frekvenci otáčení spermie, které jsou nezbytné pro progresivní pohyb spermie (Verstegen et al. 2002). Mortimer (1997) uvádí, že trajektorie s relativně nízkou amplitudou vybočení hlavičky (ALH) obvykle vykazují vysokou hodnotu linearity.

Frekvence křížení (BCF)

BCF, z anglického *beat-cross frequency*, udává kolikrát hlavička spermie protne svoji průměrnou dráhu za určitý čas. BCF je vyjadřována v hertzích (Hz). Frekvence křížení úzce souvisí s frekvencí kmitu bičíku (Mortimer 2000). Společně s parametry ALH a WOB popisuje oscilaci hlavičky spermie, která má vliv na přímost a progresivitu (Ramió et al. 2008).

4 Metodika

4.1 Ejakulát

K učení hlubokých neuronových sítí byly využívány kryokonzervované vzorky ejakulátu několika živočišných druhů s odlišnou morfologickou stavbou spermií. Konkrétně se jednalo o ejakulát býků, kdy právě na inseminačních stanicích býků je v praxi CASA již hojně využívána. Dále jsme používali vzorky spermií kozlů a kohoutů, které byly vybrány v nižších stupních ředění (tzn. s vyšší koncentrací buněk). U spermií kohoutů je zřejmý jejich výběr vzhledem k diametrální morfologické odlišnosti.

4.1.1 Odběr a kryokonzervace

4.1.1.1 Spermie býků

Býčí ejakulát byl odebírán od plemenných býků z inseminační stanice Natural s.r.o. (Hradištke pod Medníkem, ČR). Jednalo se o plemena český strakatý skot, holštýnský skot a montbeliard. Plemeníci byli odebíráni standardním způsobem na atrapu do umělé pochvy natemperované na 38-40 °C, s jednorázovým sběračem.

Odebraný ejakulát byl standardně zpracováván na inseminační stanici. Ihned po odběru probíhalo laboratorní posouzení. Pro další zpracování byl vybrán pouze ejakulát splňující standardní parametry (koncentrace $\geq 0,7 \times 10^9/\text{ml}$; procento motilních spermií $\geq 70 \%$). Následná kryokonzervace probíhala dle standardního protokolu (Šimoník et al. 2019).

4.1.1.2 Spermie kozlů

Kozlí ejakulát byl získán od kozlů plemene koza sánská z inseminační stanice Chorušice a.s.. Plemeníci byli odebíráni standardním způsobem na fantom do umělé pochvy natemperované na 38-40 °C, s jednorázovým sběračem. Odebraný ejakulát byl laboratorně posouzen, dále zpracován a kryokonzervován dle metodiky Vidal et al. (2013).

4.1.1.3 Spermie kohoutů

Ejakulát kohoutů byl získán manuální masturbací do odběrových mikrozkrumavek. Odběr probíhal na farmě Chorušice a.s.. Jednalo se o plemeno vlašských kohoutů. Ředění a kryokonzervace probíhala dle metodiky Mocé et al. (2010).

4.1.2 Příprava vzorků

Inseminační dávky byly rozmrazeny ve vodní lázni při teplotě 37 °C po dobu 30 sekund. Po rozmrazení byly vzorky býčího ejakulátu naředěny médiem Sp-TALP (připraveno podle Parrish et al. 1988; Sp-TALP = 114 mM NaCl, 3,2 mM KCl, 25 mM NaHCO₃, 0,3 mM NaH₂PO₄·4H₂O, 10 mM HEPES, 10 mM laktát sodný, 2 mM CaCl₂·2H₂O, 0,5 mM MgCl₂·6H₂O, 6 mg/ml BSA, 1 mM pyruvát sodný, 50 µl/ml gentamycin). Konečná koncentrace spermií ve vzorku po naředění Sp-TALP byla 20×10^6 spermií/ml.

Následně bylo do počítačích komůrek typu Makler (Sefi Medical Instruments, Haifa, Israel), napipetováno 4 μ l vzorku. Počítací komůrky typu Makler jsou 10 μ m hluboké a obsahují 6 snímacích polí. Na každé pole bylo snímáno v průměru 200 spermií.

4.2 Zpracování vzorků spermií pomocí CASA systému NIS Elements

Pro převod mikroskopického obrazu připravených vzorků ejakulátu do digitální formy byl použit CASA optický systém. Použitá optická sestava se skládala z fázového kontrastního mikroskopu (Eclipse E600, Nikon, Tokyo, Japonsko) s digitální kamerou o frekvenci 60 fps (DMK 23UM021, Imaging Source, Německo) a vyhřívacím stolkem (TokaiHit, Shizuoka, Japonsko).

Vzorky byly nahrány do CASA softwaru NIS-Elements. NIS-Elements neboli Nikon Imaging Software, je ucelené softwarové řešení pro analýzu obrazu určené pro laboratoře, výzkumná pracoviště, univerzity a průmyslové provozy. Tento software plně využívá možnosti automatizace mikroskopů, kamer a dalších optických systémů, a kombinuje je s vyspělými algoritmy pro zpracování a analýzu obrazu. Systémy založené na softwaru NIS-Elements tak nabízejí funkce pro kompletní řešení jakýchkoliv úloh, jehož součástí jsou snímání, analýza, vizualizace, archivace obrazu a prezentace naměřených dat (Laboratory Imaging 2020).

Pro manuální segmentaci spermií a přípravu tréninkových dat pro analýzu motility byl využíván starší software NIS-Elements verze 4.50. Pro trénování umělé inteligence byl použit pokročilejší software NIS-Elements verze 5.30.

Z každého vzorku bylo nasnímáno šest náhodných polí, ze kterých bylo možné vyhodnotit následující kinematické parametry – TMOT [%], PMOT [%], VSL [μ m/s], VCL [μ m/s], VAP [μ m/s], LIN [%], STR [%], WOB [%], ALH [μ m], BCF [Hz].

4.2.1 Segmentace spermií pomocí Binary Toolbar nástrojů

Segmentace je proces, který dělí obraz na části, což umožňuje separovat objekty a struktury v obrazu, např. detekce tumoru v biomedicíně (Kizrak 2019).

Pro natrénování softwaru k identifikaci objektů pomocí umělé inteligence bylo zapotřebí vybrat vhodný soubor tréninkových dat. V tomto případě se jednalo o 100 vzorků býčích spermií, od osmi plemenů tří různých plemen (český strakatý skot $n=4$, holštýnský skot $n=3$, montbeliard $n=1$). Důležitá byla zejména snaha o heterogenní výběr vzorků v různých koncentracích, aby bylo možné sít připravit na co nejrůznější situace, jako jsou kolize spermií či přítomnost nespermatických částic obsažených v ředidle.

Z každého ze sta vzorků (jeden vzorek = 41 snímků) byly vybrány dva snímky, tj. celkem bylo k dispozici 200 tréninkových snímků.

Prvním krokem manuální segmentace byl nástroj „Define threshold“, který umožňuje uživatelské nastavení rozmezí intenzity jasu v pixelech (minimální a maximální hodnota), které zjednodušuje prvotní výběr objektů (spermií) podle svítivosti pixelů. „Define threshold“ nástroj (viz Obrázek 15) umožňuje také drobné úpravy, jako je zakulacení výběru objektů, vyhlazení, či odstranění výběru menších částic (např. součásti ředidla, nečistoty, buněčný debris apod.).

Detailnější výběr byl proveden prostřednictvím nástroje „Binary Toolbar“, který umožňuje ručně definovat hranice požadovaného objektu, rozdělit dva či více spojených objektů, nebo vymazat objekt, který do výběru nepatří (nečistoty, buněčný debris apod.). Cílem těchto úprav bylo přesné obkreslení hlaviček všech spermií na všech snímcích (viz Obrázek 16). Důraz byl kladen hlavně na rozdělení hlaviček spermií, které se překrývaly, a jejich pečlivé obkreslení. Takto zpracované snímky následně sloužily jako tréninková předloha pro učení hlubokých neuronových sítí.

Stejným způsobem byla zpracována tréninková data i pro spermie kozlů a kohoutů.

4.2.2 Tracking – analýza motility

Pro natrénování hlubokých neuronových sítí k analýze motility spermií bylo vybráno 25 kompletních tréninkových souborů dat, tj. vždy všech šest nasnímaných polí. Jednalo se o 25 vzorků kryokonzervovaného ejakulátu býků. Byly vybrány jak standardní vzorky typické pro motilitu býčích spermií, tak nestandardní, např. vzorky s příliš vysokou koncentrací, přítomností částic nespermatického původu (tzn. častými kolizemi).

Vzorky byly nasegmentovány pomocí nástroje Binary Toolbar. Před spuštěním analýzy bylo potřeba upravit nastavení, tak aby vyhovovalo požadavkům uživatele na konkrétní druh spermií – tj. hodnota threshold, velikost objektu, cirkularita, elongace, multiplikační faktor, maximální rychlost objektu, počet snímků, ze kterých se má vyhodnocovat VAP parametr, minimální počet snímků, na kterých se daný objekt musí vyskytovat, aby mohl být zahrnut do analýzy (viz Obrázek 17) Konkrétní hodnoty použité SpermMotility analýzy jsou definovány v Tabulce 2. Po nastavení parametrů byla spuštěna analýza motility NIS-Elements softwaru.

Tab. 2: Nastavené parametry SpermMotility analýzy.

Parametr	Nastavení
Threshold	85-255, resp. 65-255
Smooth, Clean, Fill holes, Separate	OFF
Size	3-10 μm
Circularity	0-1
Elongation	1 - ∞
Max Object Speed	800 $\mu\text{m/s}$
StDev Multiplication Factor	3,0 stdev
Join tracks up to	3 frames apart
VAP Averaging	9 points
Remove tracks shorter than	21 segments

Takto zpracovaná data sloužila jako podklad pro učení hlubokých neuronových sítí k vypracování analýzy motility (viz Obrázek 18).

Následně byly analyzované vzorky duplikovány, čímž vznikly dvě identické databáze. Jedna databáze obsahovala vzorky s vypracovanou SpermMotility analýzou (viz Tabulka 2). Z druhé databáze se veškeré analýzy vymazaly. Tato později sloužila jako kontrolní, pro ověření schopnosti sítě provést správně analýzu motility.

4.3 Trénování hlubokých neuronových sítí NIS-Elements

Samotné trénování hlubokých neuronových sítí bylo prováděno v rámci úzké spolupráce s IT odborníky ze společnosti Laboratory Imaging s.r.o. (Praha, ČR), kteří se podílí na vývoji softwaru NIS-Elements pro společnost Nikon Corporation. Již v minulosti se katedra veterinárních disciplín ČZU (Praha, ČR), v čele s Ing. Ondřejem Šimoníkem, Ph.D., významně podílela na posunu vývoje CASA modulu NIS-Elements a aktuálně spolupráce pokračuje při implementaci umělé inteligence.

4.3.1 Implementace hlubokých neuronových sítí do softwaru NIS-Elements

Pro implementaci umělé inteligence (AI, z angl. *artificial intelligence*) do softwaru NIS-Elements byla využita plně konvoluční síť typu U-Net (Ronneberger et al. 2015). Pro tento účel bylo doporučeno používat software NIS-Elements ve verzi 5.20.01 a novější, který umožňuje aktivaci hlubokých neuronových sítí.

Dle původního nastavení NIS-Elements 5.20.01 je možnost AI skrytá. Pro aktivaci neuronových sítí bylo nutné v instalačním adresáři softwaru provést přepis v SetupOptions.wml z hodnoty „*false*“ na „*true*“.

```
<!-- Is DeepLearning Denoising enabled? -->
    <DeepLearning runtime="CLxListVariant">
        <bEnable runtime="bool" value="true"/>
    </DeepLearning>
```

Pro aplikaci hlubokých neuronových sítí pro segmentaci objektů byl využit modul Segment.Ai.

4.3.2 Trénování hlubokých neuronových sítí

Pro trénování neuronových sítí k AI segmentaci objektů bylo použito tzv. adaptační učení s učitelem (*supervised learning*). Při učení s učitelem bylo potřeba síti poskytnout soubor vstupních dat i s očekávaným výstupem, tj. síť dostala vzor, jak by měl vypadat výsledek. K tomuto účelu byl požadován dostatečně velký dataset ND2 souborů s barevně segmentovanými ručně nadefinovanými objekty (v našem případě několik desítek tréninkových snímků, které jsou pro natrénování neuronové sítě typu U-Net zcela dostatečné). Před zahájením tréninku bylo nezbytné rozdělit data do dvou oddělených souborů. Získali jsme tak jednu sadu tréninkových dat s ručně nadefinovanými objekty, tzv. „*training*“ (train.nd2), která byla následně předložena neuronové síti k naučení segmentace. Druhá sada obsahovala stejné vzorky, ale bez zhotovené segmentace. Jednalo se tedy o originální snímky, tzv. „*validation*“ (valid.nd2), které sloužily k vyhodnocení schopnosti neuronové sítě správně identifikovat objekty. Jako „*validation*“ byla použita stejná sada vzorků jako „*training*“, bez segmentace, aby bylo možné ověřit správnost a účinnost učení neuronové sítě.

V první fázi trénování byl vybrán dataset train.nd2. V okně pro trénink AI (záložka Binary; Train Segment.Ai; viz Obrázek 19) byly nastaveny požadované parametry a vybrán název budoucího klasifikačního souboru (navez_souboru.sai, např. *train.sai*), tj. natrénované neuronové sítě. Následně byl spuštěn samotný proces učení neuronové sítě podle předložených

dat. To trvá běžné několik hodin, v závislosti na kvalitě grafického procesoru (GPU), v tomto případě konkrétně 13 hodin.

Síť implementovaná do NIS-Elements je plně konvoluční s architekturou U-Net (Ronneberger et al. 2015). Na začátku trénování byly parametry sítě inicializované náhodně. Následně probíhalo trénování iterativním postupem:

- 1) Neuronová síť si na základě poskytnutých dat vytvořila predikci (v tomto případě se jednalo o segmentaci).
- 2) Predikce neuronové sítě se porovnávala s „*ground truth*“, tj. ručně nadefinovanými objekty.
- 3) Spočítala se tzv. hodnota „*loss*“, která vyjadřuje, jak dobře odpovídá predikce neuronové sítě realitě. Pokud je hodnota „*loss*“ vysoká, predikce se výrazně liší od „*ground truth*“. Cílem je co nejnižší hodnota „*loss*“. Čím nižší je hodnota „*loss*“ tím více se predikce podobá realitě („*ground truth*“).
- 4) Spočítali se gradienty pomocí metody backpropagation. Gradient určuje, jak je potřeba změnit parametry sítě, aby byl v další iteraci výsledek lepší než v předchozím výpočtu.
- 5) Na základě gradientů si síť aktualizuje své parametry.

Celý postup trénování sítě 1) až 5) se opakoval, dokud nebyla hodnota „*loss*“ dostatečně nízká. Na začátku trénování bývají výsledky obvykle neuspokojivé, protože síť byla inicializována náhodně. S opakujícím se tréninkovým procesem se schopnosti sítě zlepšují.

Výsledkem byla natrénovaná neuronová síť, která je schopná identifikovat objekty (tj. býčí, kozlí nebo kohoutí spermie), které se naučila podle tréninkových souborů, a vypracovat jejich pohybovou analýzu.

Po úspěšném natrénování neuronové sítě bylo možné používat software NIS-Elements v režimu AI. Proces AI segmentace a spuštění analýz lze provést prostřednictvím okna General Analysis 3 (viz Obrázek 20).

4.3.3 Ověření správnosti segmentace pomocí hlubokých neuronových sítí

Pro ověření správnosti natrénování sítě byla využita druhá sada vzorků „*validation*“ (val.nd2). Nově natrénovaná síť pro AI segmentaci je umístěna v nově vzniklé záložce Binary – Segment.Ai, nebo v okně General Analysis 3 (Ga3), viz Obrázek 21. Výsledkem po spuštění AI segmentace je nová binární vrstva (*binary layer*) s označenými objekty, které neuronová síť, podle naučené segmentace z tréninkových dat, považuje za spermie.

Kontrolní dataset (*validation*) obsahoval snímky s původními „*ground truth*“ objekty (tj. objekty, které byly ručně segmentovány jako spermie) a „*predicted*“ objekty, které byly vyhodnoceny jako spermie na základě AI analýzy.

Pro zhodnocení výsledků segmentace pomocí neuronové sítě jsme využili kvantitativních metod v General Analysis 3. Ga3 porovnává „*ground truth*“ a „*predicted*“ objekty a na základě prahování je třídí do tří kategorií – TP, FP a FN. Ve vizuální projekci označujeme TP zeleně, FP modře a FN červeně (viz Obrázek 22). Rozdělení do kategorií TP, FP a FN je vysvětleno v Tabulce 3.

Tab. 3: Pro zhodnocení úspěšnosti segmentace pomocí umělé inteligence lze rozdělit identifikované objekty do tří kategorií TP, FP a FN.

Zkratka	Název	Vysvětlení
TP	<i>true positive</i>	Objekt byl správně identifikován, tj. <i>prediction</i> a <i>ground truth</i> vzájemně odpovídají.
FP	<i>false positive</i>	Objekt byl neuronovou sítí chybně identifikován jako spermie.
FN	<i>false negative</i>	Objekt byl sítí chybně vynechán, tj. neidentifikován jako spermie, i když se dle reálného vzoru <i>ground truth</i> o spermii jedná.

Na základě rozdělení predikovaných objektů do kategorií TP, FP a FN, byly vypočítány další míry, nazývané jako *precision*, *recall* a F1 (viz obrázek 23). Tyto míry se využívají zejména při hodnocení úspěšnosti detekce pomocí automatických nástrojů a jejich hodnota se pohybuje v rozmezí 0 až 1.

Míra *precision* udává, kolik objektů, z celkově predikovaných umělou inteligencí, je ve skutečnosti (dle *ground truth*) požadovaným objektem. Je definována jako poměr relevantních výsledků analýzy ke všem výsledkům získaných analýzou. *Precision* lze přeložit jako přesnost nebo také čistotu daného výsledku, tj. schopnost detekovat pouze požadované objekty (Shung 2018).

Recall neboli výtěžnost je poměr relevantních výsledků analýzy ke všem relevantním výsledkům ve zkoumaném vzorku, bez ohledu na to, zda byly analýzou identifikovány (Shung 2018).

Pokud by hodnota *precision* byla rovna jedné, znamenalo by to, že každý detekovaný objekt je relevantní, ale neříká nic o tom, zda byly detekovány všechny relevantní objekty. Zatímco pokud by se hodnota *recall* byla rovna jedné, znamenalo by to, že všechny relevantní objekty byly identifikovány, ale neposkytuje nám informaci o tom, kolik objektů bylo oproti *ground truth* detekováno chybně (Estrada & Jepsen 2009).

F-score, jinak také *F-measure*, vyjadřuje vztah mezi *precision* a *recall*. Je definováno jako vážený harmonický průměr *precision* a *recall* (Shung 2018). Obecný vzorec F-score je následující:

$$F\beta = \frac{(1 + \beta^2) * (precision * recall)}{(\beta^2 * precision + recall)}$$

Při nastavení $\beta = 1$ je F-score označováno jako F1, kdy jsou váhy *precision* i *recall* vyrovnané (Lever et al. 2016).

Vzorce pro výpočet hodnot *precision*, *recall* a F1 jsou uvedeny v Tabulce 4.

Tab. 4: Vzorce pro výpočet hodnot *precision*, *recall* a F1.

	Vzorec
Precision	$precision = TP / (TP + FP)$
Recall	$recall = TP / (TP + FN)$
F1	$F1 = 2 \times precision \times recall / (precision + recall)$

4.4 Statistická analýza

Výsledky segmentace a tracking analýz byly ze softwaru NIS-Elements (verze 5.30) exportovány prostřednictvím nástroje General Analysis 3. Pro hodnocení úspěšnosti segmentace byly z General Analysis 3 exportovány výsledky parametrů *true positive* (TP), *false positive* (FP), *false negative* (FN), *recall*, *precision* a F1.

Pro zhodnocení schopnosti neuronové sítě vypracovat tracking analýzu byly vyexportovány výpočty kinematických parametrů – TMOT, PMOT, VSL, VCL, VAP, LIN, STR, WOB, ALH a BCF.

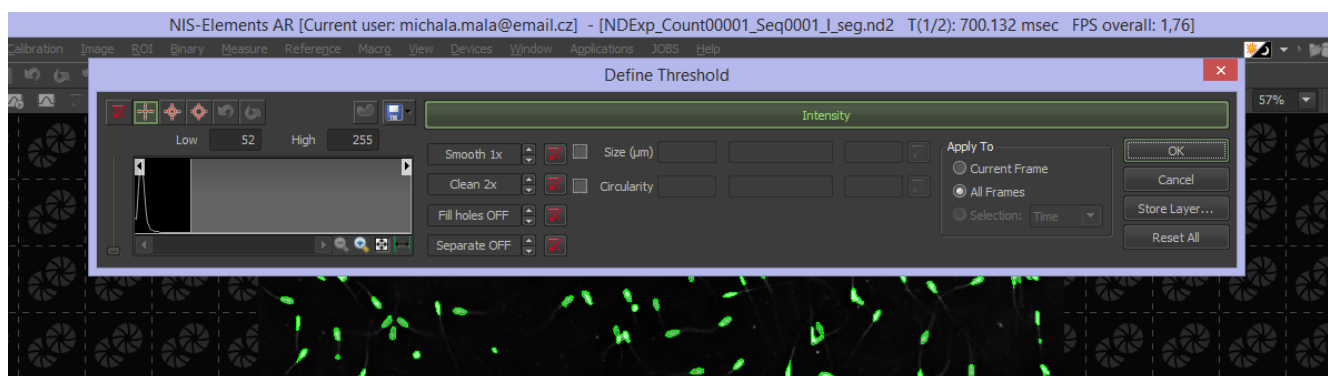
Exportované výsledky motility analýzy byly číselně vyjádřeny aritmetickým průměrem s uvedením střední chyby průměru ($\bar{x} \pm S.E.M.$).

Statistická analýza byla provedena v softwaru Statistica (verze 12, StatSoft, ČR). Pro ověření hypotézy při porovnávání výsledků motility analýzy byl využit párový t-test. Hladina statistické významnosti byla stanovena na $p < 0,01$.

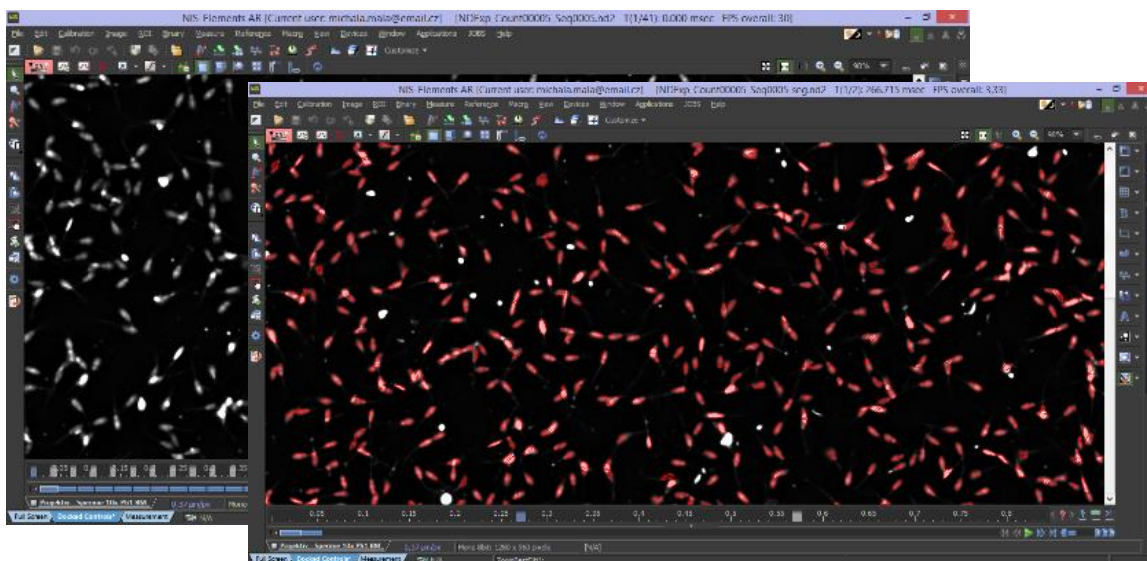
Pro grafické znázornění výsledků byly využity výsečové grafy, kombinované (spojnicový + skupinový sloupcový) a krabicové grafy, které uvádí medián, 25. a 75. percentil a extrémní hodnoty (minimum a maximum) souboru.

4.5 Grafický protokol procesu trénování neuronové sítě v NIS-Elements

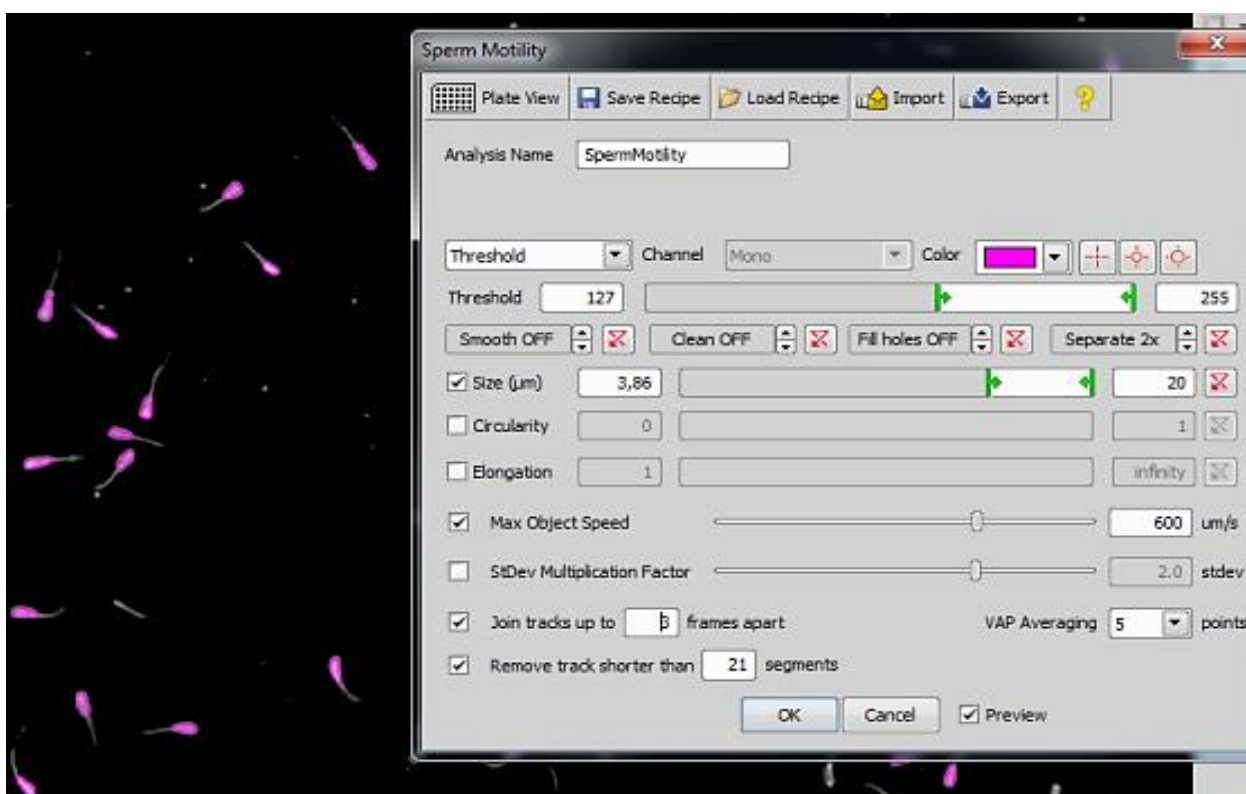
Následující snímky znázorňují průběh tvorby tréninkového datasetu (segmentace spermií, tracking analýza) a trénování neuronové sítě v softwaru NIS-Elements.



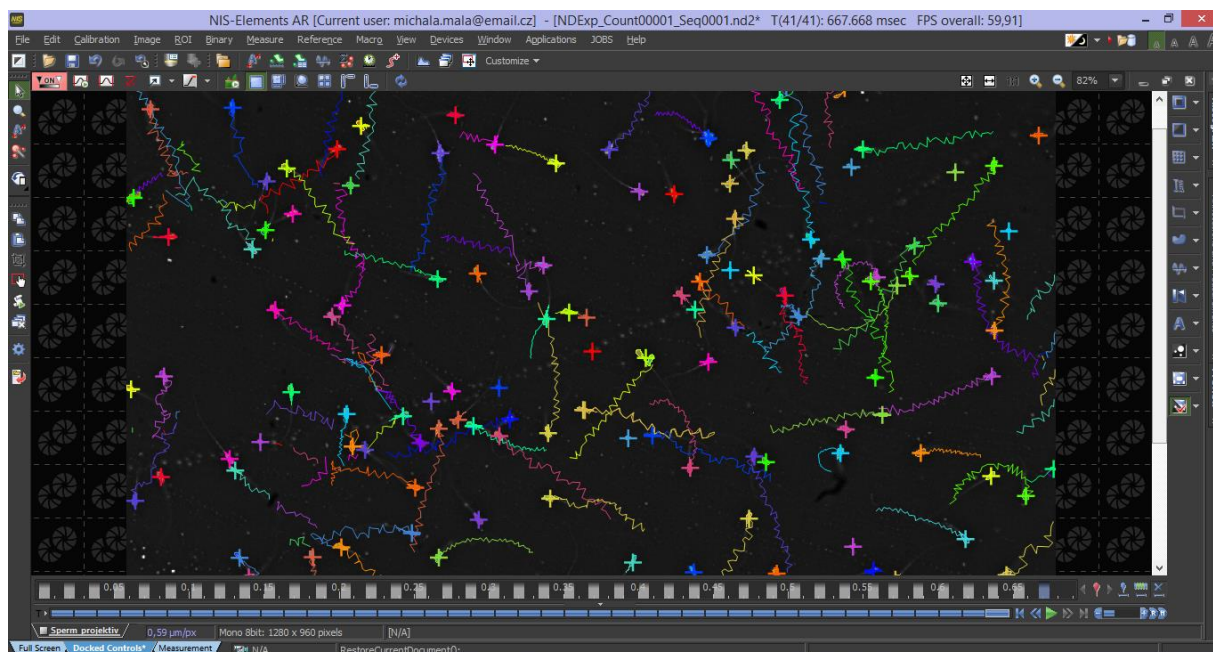
Obr. 15: Ikona nástroje Define Threshold, která umožňuje prvotní „hrubý“ výběr objektů. V pozadí je vidět snímek s vybranými spermiemi, podle zadaných parametrů (NIS Elements 4.50, Laboratory Imaging 2020).



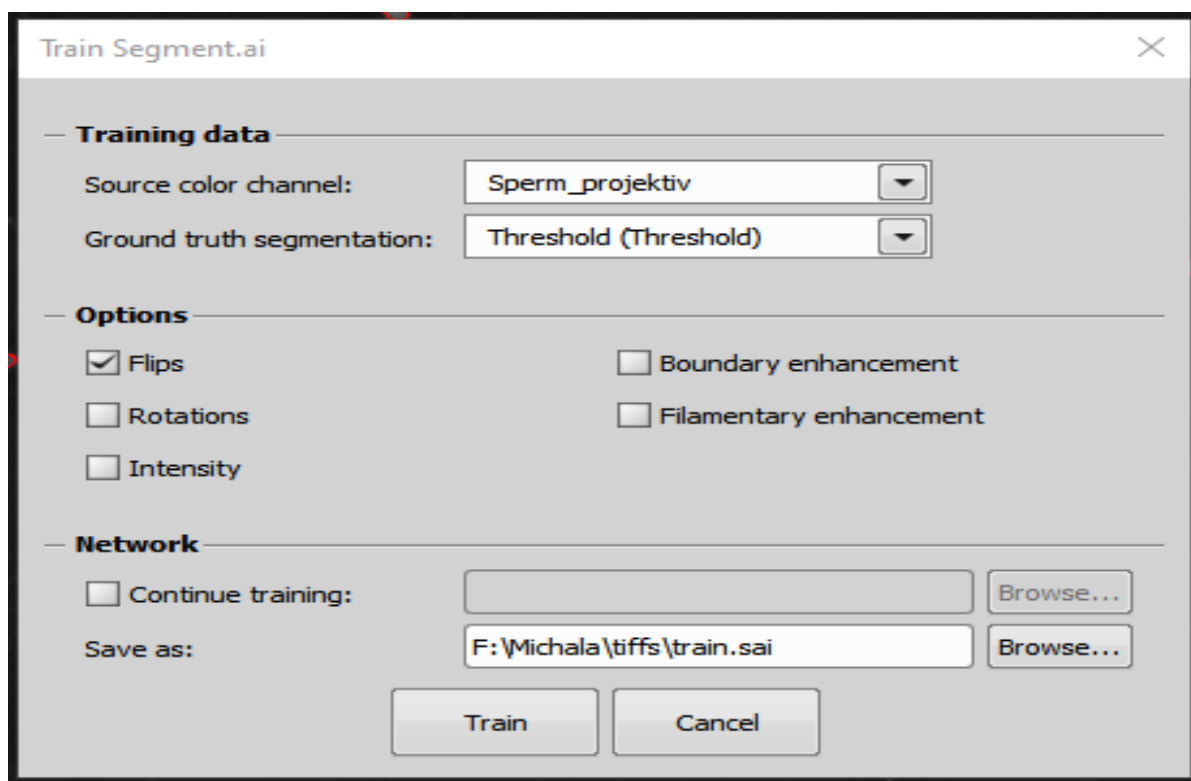
Obr. 16: Snímek před segmentací a po manuální segmentaci, jako předloha pro učení AI (NIS Elements 4.50, Laboratory Imaging 2020).



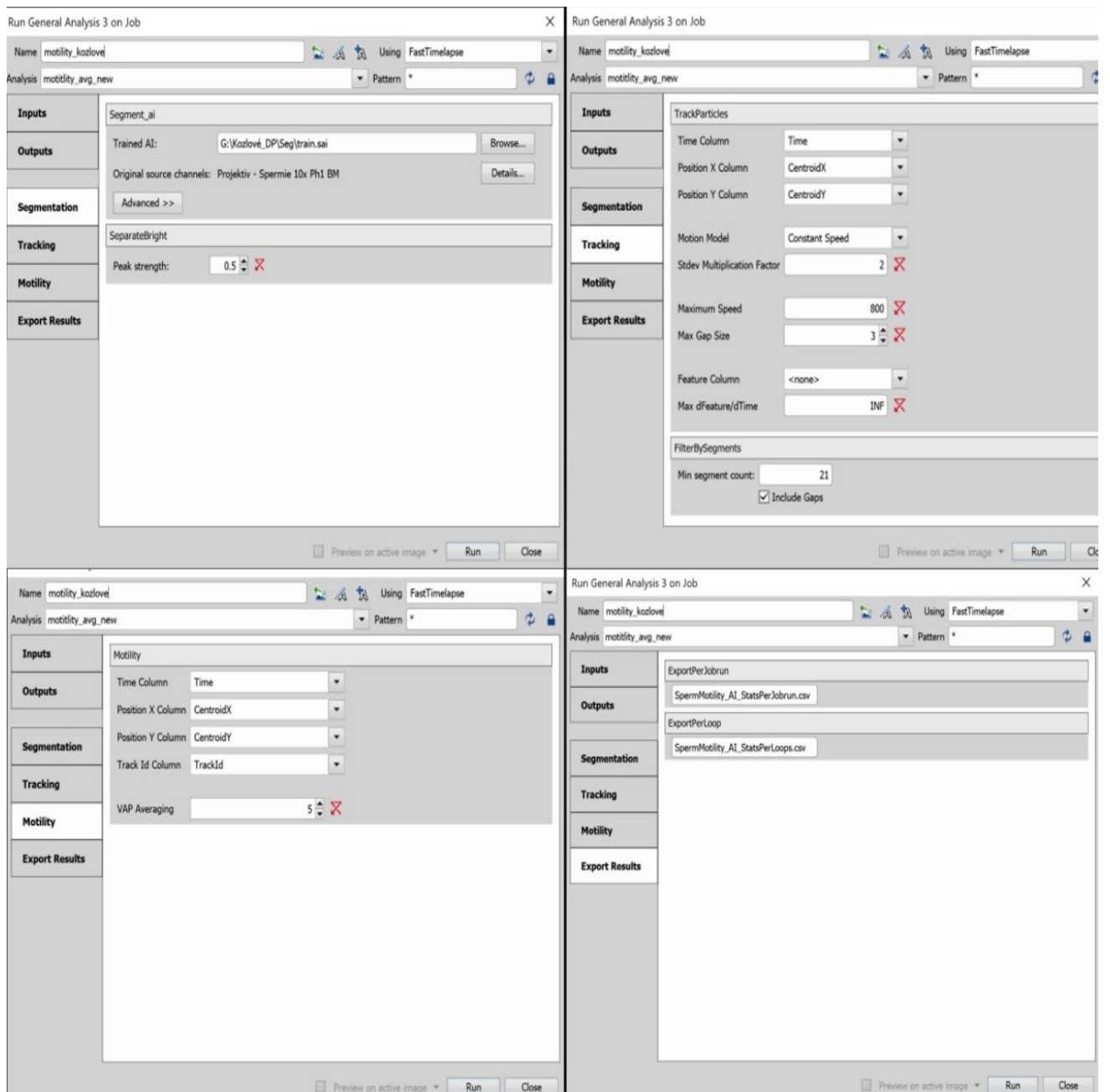
Obr. 17: SpermMotility okno umožňuje nastavení parametrů pro analýzu motility spermii (NIS-Elements 4.50, Laboratory Imaging 2020).



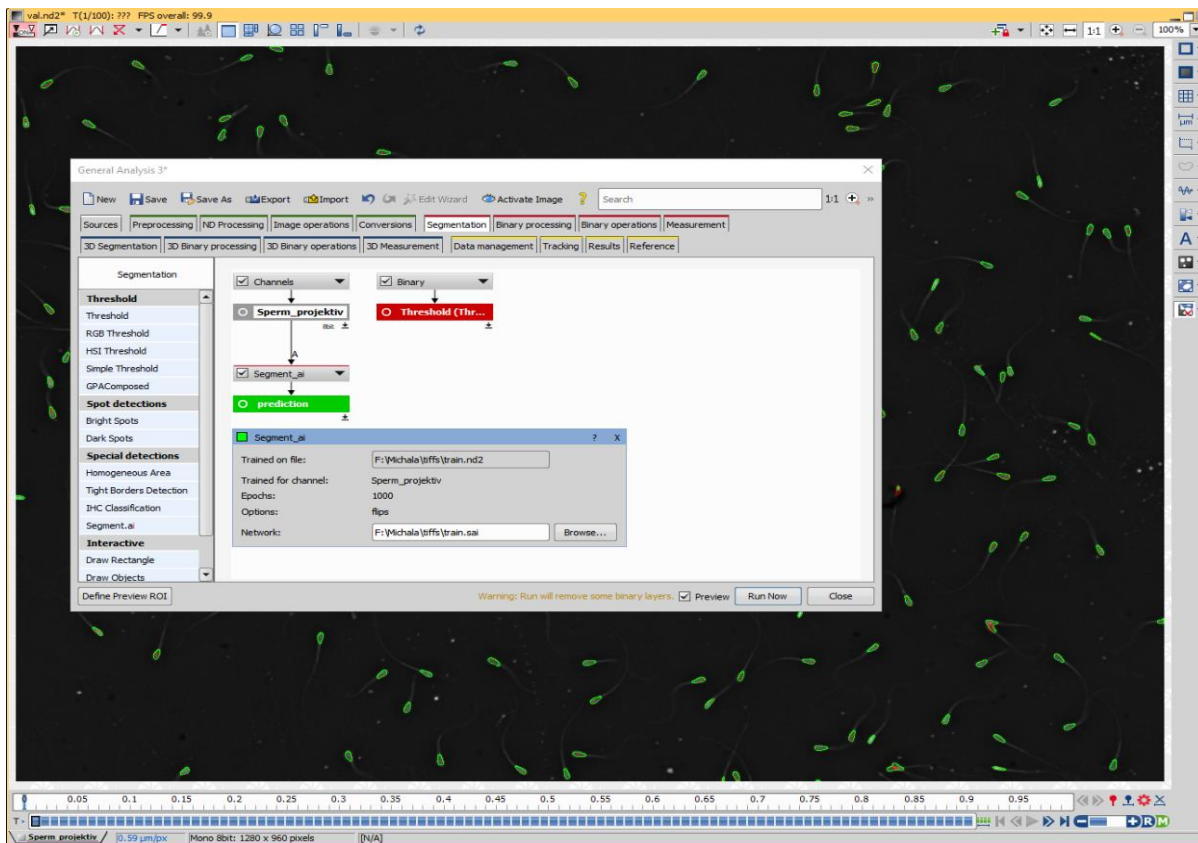
Obr. 18: Snímek obrazovky s grafickým znázorněním drah jednotlivých spermií při analýze motility (NIS Elements 4.50, Laboratory Imaging 2020).



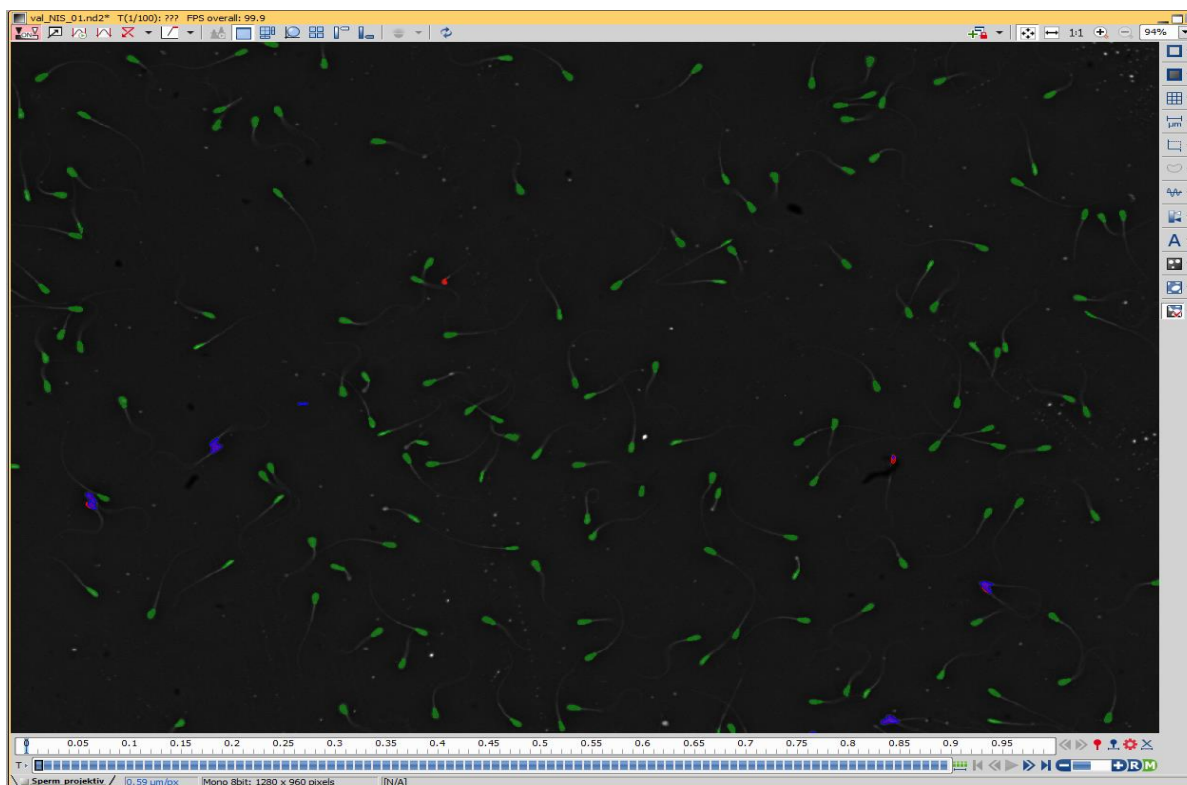
Obr. 19: Proces spuštění trénování hlubokých neuronových sítí v modulu Segment.Ai. Záložka „Training data“ slouží k nahrání tréninkového datasetu. V záložce „Network“ je potřeba zvolit místo uložení a název budoucí neuronové sítě s příponou .sai (NIS-Elements 5.30, Laboratory Imaging 2020).



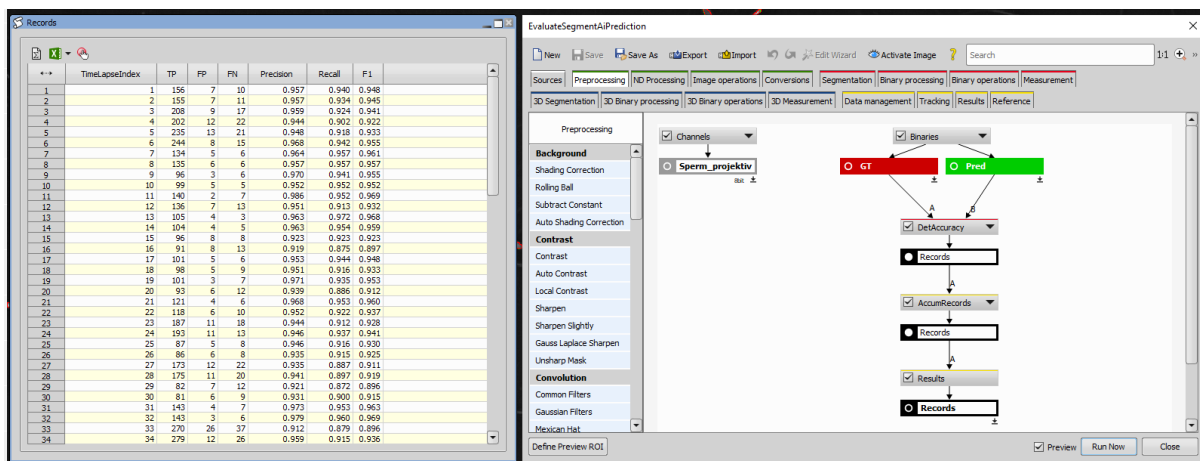
Obr. 20: Snímek obrazovky znázorňující postup spuštění AI segmentace a analýzy. 1. výběr natrénované neuronové sítě pro daný druh, 2. a 3. uživatelské nastavení parametrů pro tracking a analýzu motility, 4. volba umístění exportovaných výsledků (NIS-Elements 5.30, Laboratory Imaging 2020).



Obr. 21: Schématické znázornění neuronové sítě v Ga3 a výsledná segmentace AI na kontrolním „validation“ datasetu (NIS-Elements 5.30, Laboratory Imaging 2020).



Obr. 22: Snímek obrazovky validačních dat. Objekty jsou rozříděny do tří kategorií TP (zelená), FP (modrá), FN (červená), podle úspěšnosti AI v segmentaci oproti tréninkovým datům (NIS-Elements 5.30, Laboratory Imaging 2020).

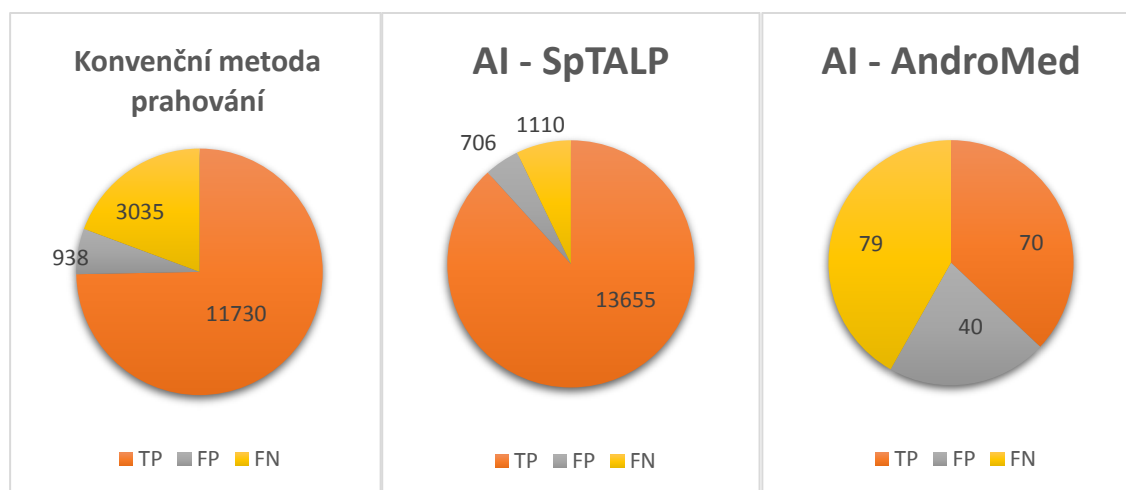


Obr. 23: Snímek obrazovky zobrazující tabulku s hodnotami parametrů TP, FP, FN, *precision*, *recall* a F1 a General Analysis 3 se schématem postupu hodnocení správnosti segmentace (NIS-Elements 5.30, Laboratory Imaging 2020).

5 Výsledky

5.1 Výsledky segmentace býčích spermií

Pro natrénování neuronových sítí k segmentaci spermií byly k dispozici standardní vzorky ejakulátu býků a vzorky býků v ředidle AndroMed®. Snímky býčího ejakulátu nařaděné AndroMed® byly specifické svou mozaikovitou kresbou, která výrazně znesnadňovala identifikaci spermií, jak je vidět v grafu 1.



Graf 1: Porovnání úspěšnosti identifikace spermií pomocí konvenční metody prahování (*threshold*) a umělé inteligence (AI – SpTALP) z celkového reálného počtu spermií *ground truth* GT = 14 765, resp. GT = 149 u vzorků v ředidle AndroMed®. TP = *true positive*, FP = *false positive*, FN = *false negative*.

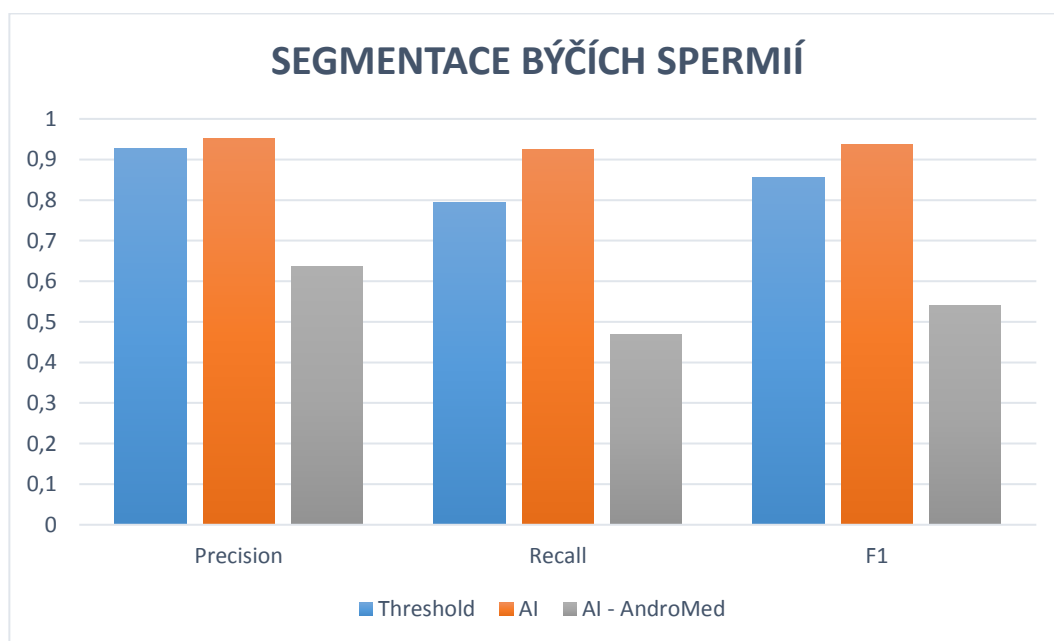
Z grafu 1 je zřejmé, že segmentace býčích spermií byla úspěšnější při použití umělé inteligence, než při konvenční metodě prahování (*threshold*). Z celkového počtu 14 765 spermií, dokázala AI úspěšně identifikovat 13 655, tj. 92,48 %, zatímco při *threshold* segmentaci bylo správně detekováno 11 730 spermií, tj. 79,45 %. Naopak při segmentaci býčích spermiích v ředidle Andromed úspěšnost AI segmentace činila pouze 46,98 %.

Hodnoty *precision*, *recall* a F1, které se běžně využívají pro hodnocení metod souvisejících s identifikací objektů a poukazují na přesnost a efektivnost natrénované sítě, umožňují porovnat segmentaci spermií konvenčním způsobem prahování (*threshold*) v NIS Elements verze 4.50 s výsledky segmentace pomocí natrénované hluboké neuronové sítě implementované v softwaru NIS Elements verze 5.30.

Tab. 5: Hodnoty *precision*, *recall* a F1 pro segmentaci standardních vzorků býků pomocí *threshold* a umělé inteligence (AI), a AI segmentace býčích vzorků v ředidle AndroMed®.

	Precision	Recall	F1
Threshold	0,926	0,794	0,855
AI – SpTALP	0,951	0,925	0,938
AI – AndroMed	0,636	0,470	0,541

Z hodnot *precision*, *recall* a F1 v tabulce 5 je zřejmé, že segmentace standardních vzorků býčích spermií byla přesnější při použití umělé inteligence než při konvenční metodě prahování. Obecně platí, že čím vyšší je hodnota F1 (na stupnici od 0 do 1), tím efektivnější je algoritmus pro danou obrazovou segmentaci. Jak je vidět v grafu 2, segmentace pomocí umělé inteligence předčila konvenční metodu především v hodnotě *recall*, která udává poměr relevantních výsledků analýzy ke všem relevantním výsledkům ve zkoumaném vzorku. Naopak, při segmentaci býčích vzorků ejakulátu v ředidle AndroMed® dosahovala síť výrazně horších výsledků než při segmentaci standardních vzorků, tak i než konvenční metoda prahování (*threshold*).

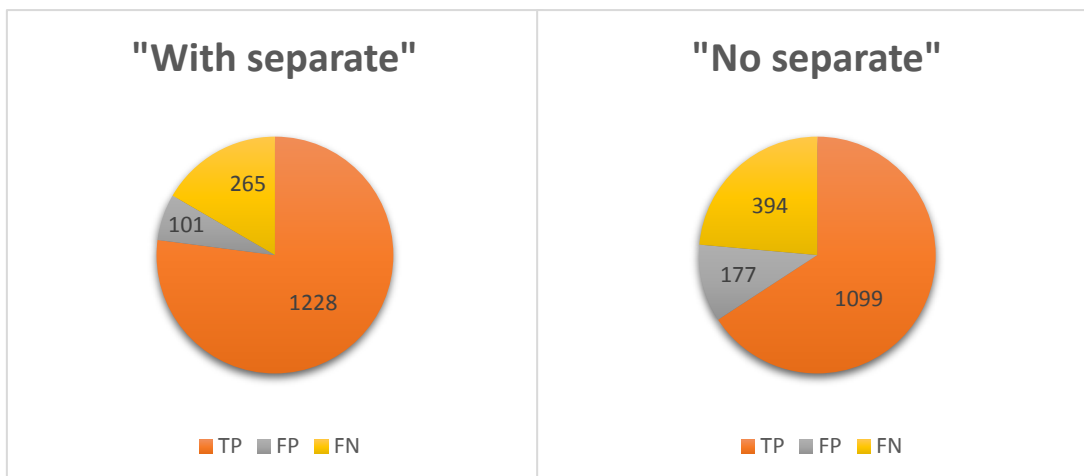


Graf 2: Porovnání hodnot *precision*, *recall* a F1 u býčího ejakulátu při konvenční metodě prahování (*threshold*), při segmentaci vzorků býčího ejakulátu v Sp-TALP pomocí umělé inteligence (AI) a při segmentaci vzorků býčího ejakulátu v ředidle AndroMed®.

5.2 Výsledky segmentace kozlích spermií

Pro zhodnocení kvality segmentace kozlích spermií bylo potřeba, stejně jako u vzorků býků, vyexportovat data z General Analysis 3. Tento nástroj umožňuje na základě porovnání s reálným vzorem (*ground truth*) roztrždit predikované objekty do tří kategorií – TP, FP a FN. Navíc byly tyto vzorky záměrně vybrány pro jejich vyšší koncentraci spermií, což sloužilo pro ověření fungování umělé inteligence v suboptimálních podmínkách.

Segmentace kozlích spermií natrénovanou neuronovou sítí byla hodnocena ve dvou částech. V první části byla hodnocena natrénovaná síť stejně jako v případě býčích spermií. Protože měl software při AI segmentaci problémy při rozdělování překrývajících se spermií, vyzkoušeli jsme v druhé části hodnocení dodatečně zapnout v nastavení NIS-Elements funkci „*Object separate bright*“ (v tabulce 6 jako „*with separate*“), která vylepšuje schopnost sítě rozlišovat překrývající se spermie.



Graf 3: Porovnání úspěšnosti identifikace spermií pomocí *threshold* a umělé inteligence z celkového reálného počtu spermií *ground truth* GT = 1 493. TP = *true positive*, FP = *false positive*, FN = *false negative*. Graf označený názvem „with separate“ znázorňuje výsledky segmentace pomocí AI se zapnutou funkcí „*Object separate bright*“.

Z dat zaznamenaných v grafu 3 vyplývá, že AI segmentace kozlích spermií byla úspěšnější při použití funkce „*Object separate bright*“, než bez ní. Při použití separační funkce dokázala síť identifikovat 1 228 spermií z celkového počtu 1 493, tj. 82,25 %, zatímco při AI segmentaci bez zapnuté funkce „*Object separate bright*“ bylo správně detekováno 1 099 spermií z celkového počtu 1 493, tj. 73,61 %.

V tabulce 6 jsou zaznamenány výsledky segmentace kozlích spermií pomocí natrénované hluboké neuronové sítě v NIS Elements 5.30. Výsledky jsou opět rozděleny do dvou částí – „no separate“ a „with separate“ s dodatečně zapnutou funkcí „*Object separate bright*“. Z hodnot *precision*, *recall* i F1 vyplývá, že segmentace kozlích spermií byla úspěšnější s přídatnou funkcí „*Object separate bright*“, která napomáhá rozdělení a identifikaci překrývajících se objektů.

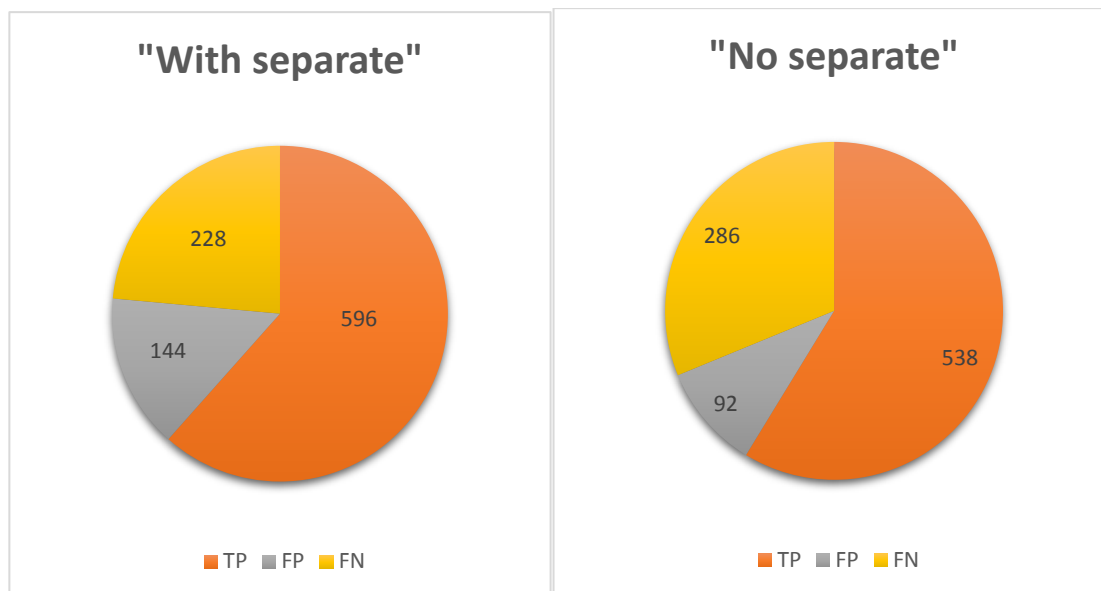
Tab. 6: Hodnoty *precision*, *recall* a F1 pro segmentaci vzorků kozlího ejakulátu pomocí umělé inteligence (AI). Označení „no separate“ značí výsledky bez zapnuté přídatné funkce „*Object separate bright*“, naopak „with separate“ označuje výsledky se zapnutou přídatnou funkcí.

	Precision	Recall	F1
AI – kozlové „no separate“	0,862	0,737	0,794
AI – kozlové „with separate“	0,924	0,823	0,871

5.3 Výsledky segmentace kohoutích spermií

Pro zhodnocení kvality segmentace kohoutích spermií pomocí natrénované neuronové sítě v NIS Elements 5.30 bylo potřeba, stejně jako u vzorků býků a kozlů, vyexportovat data z General Analysis 3.

Stejně jako u kozlích spermií, také vzorky kohoutích spermií byly extrémně koncentrované, a navíc se výrazně odlišovaly morfologickou stavbou. Proto byla i při segmentaci kohoutích spermií k již naučené síti (označena jako „*No separate*“) dodatečně použita funkce „*Object separate bright*“ (označena jako „*With separate*“), která vylepšuje schopnost sítě identifikovat překrývající se spermie.



Graf 4: Porovnání úspěšnosti identifikace spermií pomocí *threshold* a umělé inteligence z celkového reálného počtu spermií *ground truth* GT = 824. TP = *true positive*, FP = *false positive*, FN = *false negative*. Graf označený názvem „*with separate*“ znázorňuje výsledky segmentace pomocí AI se zapnutou funkcí „*Object separate bright*“.

Z dat zaznamenaných v grafu 4 vyplývá, že AI segmentace kohoutích spermií byla úspěšnější při použití funkce „*Object separate bright*“, než bez ní. Při použití funkce „*Object separate bright*“ dokázala síť správně identifikovat 596 spermií z celkového počtu 824, tj. 72,33 %, zatímco při AI segmentaci bez zapnuté separační funkce bylo správně detekováno 538 spermií z celkového počtu 824, tj. 65,29 %.

Tab. 7: Hodnoty *precision*, *recall* a F1 pro segmentaci vzorků kohoutího ejakulátu pomocí umělé inteligence (AI). Označení „*no separate*“ značí výsledky bez zapnuté přídatné funkce „*Object separate bright*“, naopak „*with separate*“ označuje výsledky se zapnutou přídatnou funkcí.

	Precision	Recall	F1
AI – kohouti „no separate“	0,854	0,653	0,740
AI – kohouti „with separate“	0,805	0,723	0,762

V tabulce 7 jsou zaznamenány výsledky segmentace kohoutích spermií pomocí natrénované hluboké neuronové sítě v NIS Elements 5.30. Výsledky jsou opět rozděleny do dvou částí – „*no separate*“ a „*with separate*“ s dodatečně zapnutou funkcí „*Object separate bright*“. Z tabulky 7 vyplývá, že hodnota *precision*, tj. schopnost detekovat pouze požadované

objekty, vykazuje lepší výsledky bez zapnuté funkce „Object separate bright“. Naopak hodnoty *recall* a F1 vycházejí lépe s dodatečně zapnutou funkcí „Object separate bright“.

5.4 AI motility tracking býčích spermií

Porovnání úspěšnosti motility analýzy býčích spermií pomocí konvenční metody a umělé inteligence (sít' train2.sai) bylo provedeno na základě výsledků desíti parametrů – celková motilita (MOT), progresivní motilita (PMOT), linearita (LIN), přímota (STR), střední dráhová rychlost (VAP), přímočará rychlost (VSL), křivočará rychlost (VCL), amplituda laterálního vybočení hlavičky (ALH), frekvence křížení (BCF), Wobble koeficient (WOB).

Tab. 8. Výsledky vypracované analýzy motility konvenční metodou prostřednictvím SpermMotility Task a pomocí umělé inteligence (AI Tracking). P-hodnota (p) vypočítaná pomocí párového t-testu.

	SpermMotility Task			AI Tracking			p
	$\bar{x} \pm \text{S.E.M.}$	medián	VK	$\bar{x} \pm \text{S.E.M.}$	medián	VK	
MOT	58,387 ± 0,894	58,306	18,747	60,765 ± 0,936	59,789	18,872	0,067171
PMOT	54,137 ± 0,805	54,947	18,210	52,783 ± 0,819	53,114	19,003	0,239389
LIN	53,313 ± 0,639	55,351	14,684	52,346 ± 0,616	54,484	14,417	0,276984
STR	91,223 ± 0,298	92,152	3,995	85,477 ± 0,435	87,035	6,232	0,00000*
VAP	112,749 ± 1,908	119,350	20,730	115,906 ± 1,850	122,238	19,547	0,235728
VSL	105,534 ± 1,962	109,812	22,770	103,040 ± 1,922	107,469	22,841	0,364670
VCL	196,986 ± 2,817	205,478	17,514	193,984 ± 2,835	202,118	17,901	0,453094
ALH	6,733 ± 0,081	6,927	14,763	4,795 ± 0,062	4,785	15,915	0,00000*
BCF	15,092 ± 0,215	15,500	17,449	9,979 ± 0,104	10,074	12,729	0,00000*
WOB	57,603 ± 0,568	59,142	12,074	60,014 ± 0,466	60,817	9,507	0,00115*

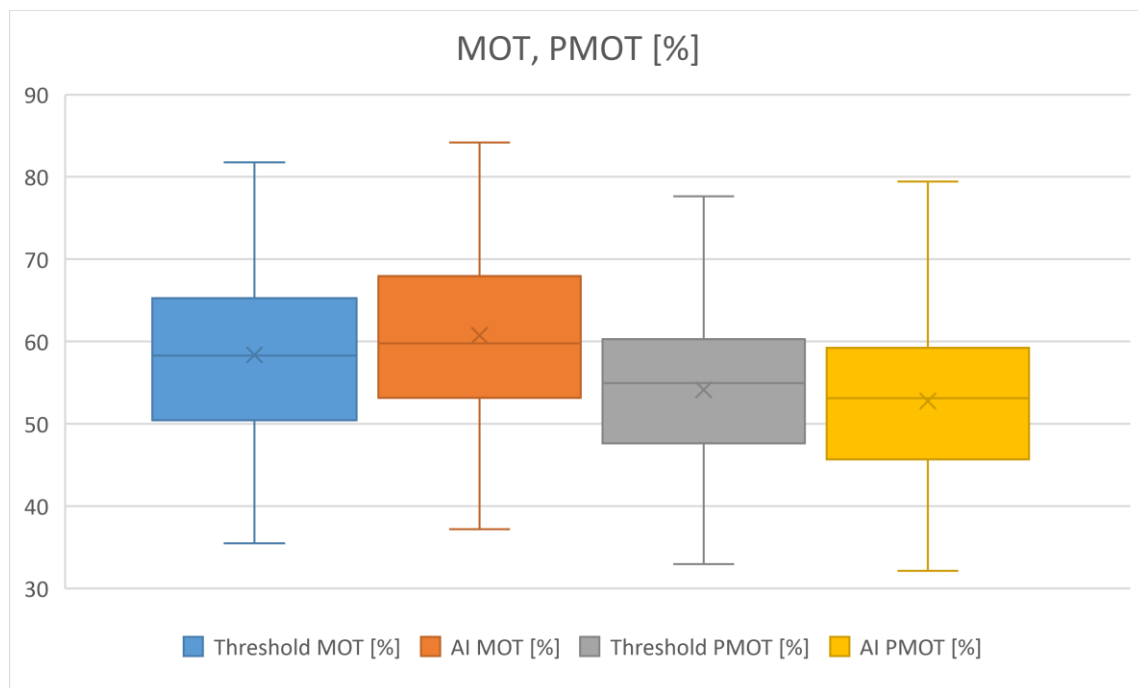
*p < 0,01

MOT – celková motilita [%], *PMOT* – progresivní motilita [%], *LIN* – linearita [%], *STR* – přímota [%], *VAP* – střední dráhová rychlost [$\mu\text{m/s}$], *VSL* – přímočará rychlost [$\mu\text{m/s}$], *VCL* – křivočará rychlost [$\mu\text{m/s}$], *ALH* – amplituda laterálního vybočení hlavičky [μm], *BCF* – frekvence křížení [Hz], *WOB* – Wobble koeficient [%].

V tabulce 8 jsou zaznamenány výsledky hodnot kinematických parametrů spermií naměřených při analýze pomocí SpermMotility Tasku a pomocí AI (n = 150). Porovnání metod (konvenční metoda x tracking pomocí umělé inteligence) pro analýzu motility v softwaru NIS-Elements bylo provedeno pomocí párového t - testu.

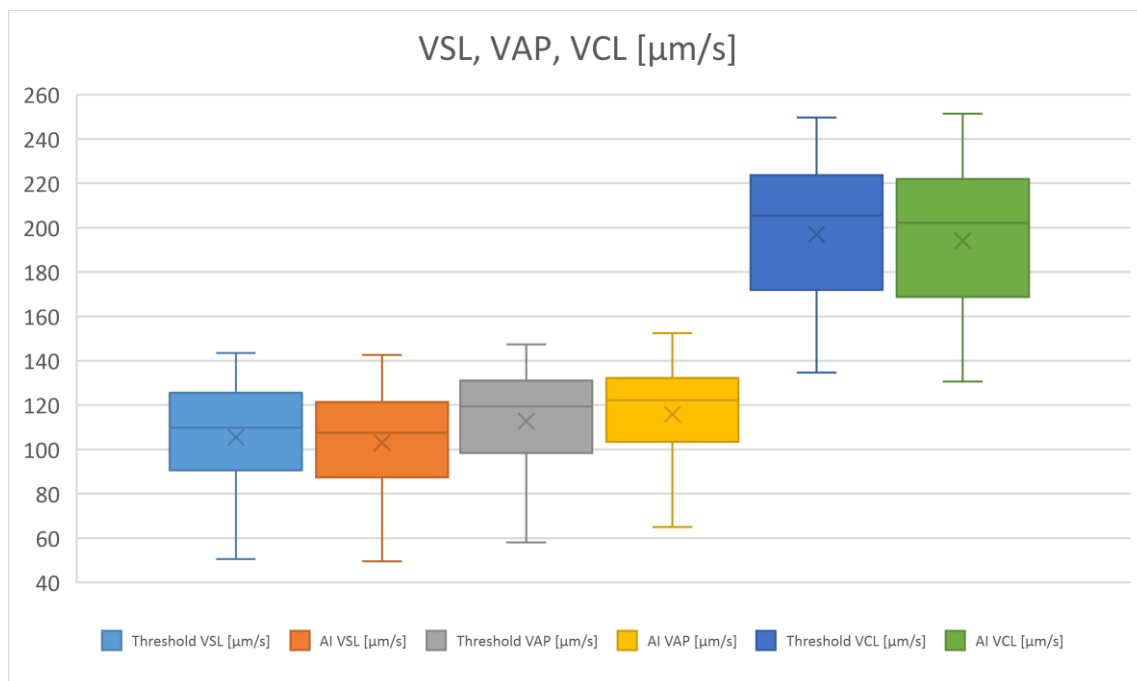
Z výsledků párového t-testu vyplývá, že u kinematických parametrů MOT, PMOT, LIN, VAP, VSL, VCL je p-hodnota vyšší než hladina významnosti p = 0,01. Tj. u těchto hodnot neexistuje statisticky významný rozdíl mezi SpermMotility analýzou a AI Trackingem. Naopak, u parametrů STR, ALH, BCF a WOB je p < 0,01, tj. existuje signifikantní rozdíl mezi manuálním nastavením segmentace spermií pro SpermMotility analýzu a trackingem vypracovaným neuronovou sítí implementovanou v softwaru NIS-Elements verze 5.30.

Čím vyšší je hodnota variačního koeficientu, tím větší je variabilita mezi hodnotami. Mezi hodnoty s největším naměřeným variačním rozpětím patří VSL, VAP, MOT a PMOT.



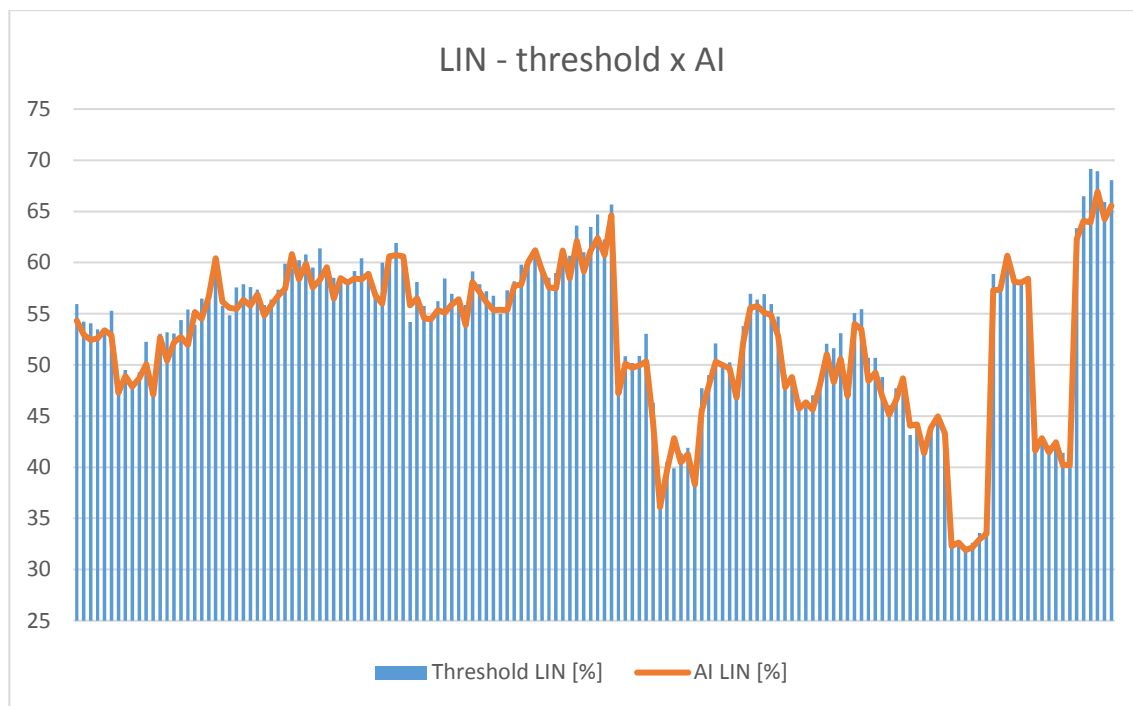
Graf 5: Porovnání výsledků celkové a progresivní motility pomocí SpermMotility tasku (*threshold*) a trackingu pomocí umělé inteligence (AI). MOT = celková motilita, PMOT = progresivní motilita.

P-hodnota vypočítaná párovým t-testem byla pro celkovou ($p = 0,067$) i progresivní motilitu ($p = 0,239$) vyšší než zvolená hladina významnosti ($p < 0,01$), tj. mezi AI a SpermMotility metodami pro analýzu celkové a progresivní motility neexistuje statisticky významný rozdíl.



Graf 6: Porovnání výsledků VSL, VAP a VCL pomocí SpermMotility tasku (*threshold*) a trackingu pomocí umělé inteligence (AI). VSL = přímočará rychlost (*velocity straight line*), VAP = střední dráhová rychlost (*velocity average pathway*), VCL = křivočará rychlost (*curvilinear velocity*).

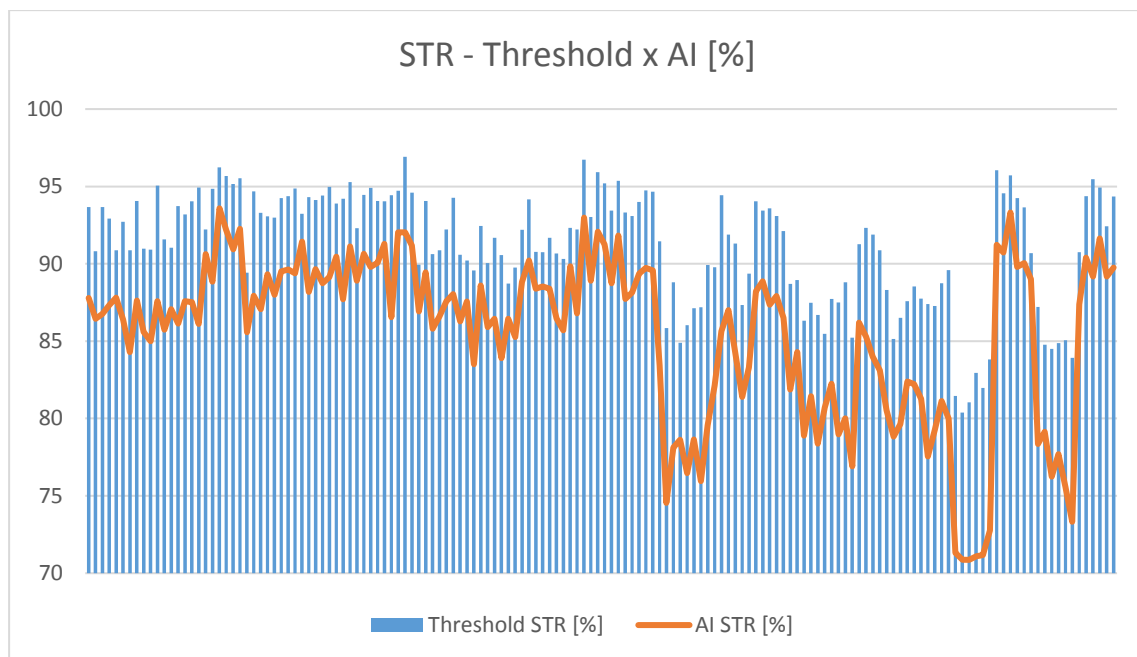
P-hodnota vypočítaná párovým t-testem byla pro přímočarou rychlost ($p = 0,365$), křivočarou rychlost ($p = 0,453$) i střední dráhovou rychlost ($p = 0,236$) vyšší než zvolená hladina významnosti ($p < 0,01$), tj. mezi AI a SpermMotility metodami pro analýzu kinematických parametrů VSL, VCL a VAP neexistuje statisticky významný rozdíl.



Graf 7: Porovnání výsledků linearity pomocí SpermMotility tasku (*threshold*) a trackingu pomocí umělé inteligence (AI). LIN = linearita ($VSL/VCL \cdot 100$).

Průměrná hodnota linearity vypočítaná při AI analýze byla nižší než při konvenční metodě analýzy pomocí SpermMotility tasku.

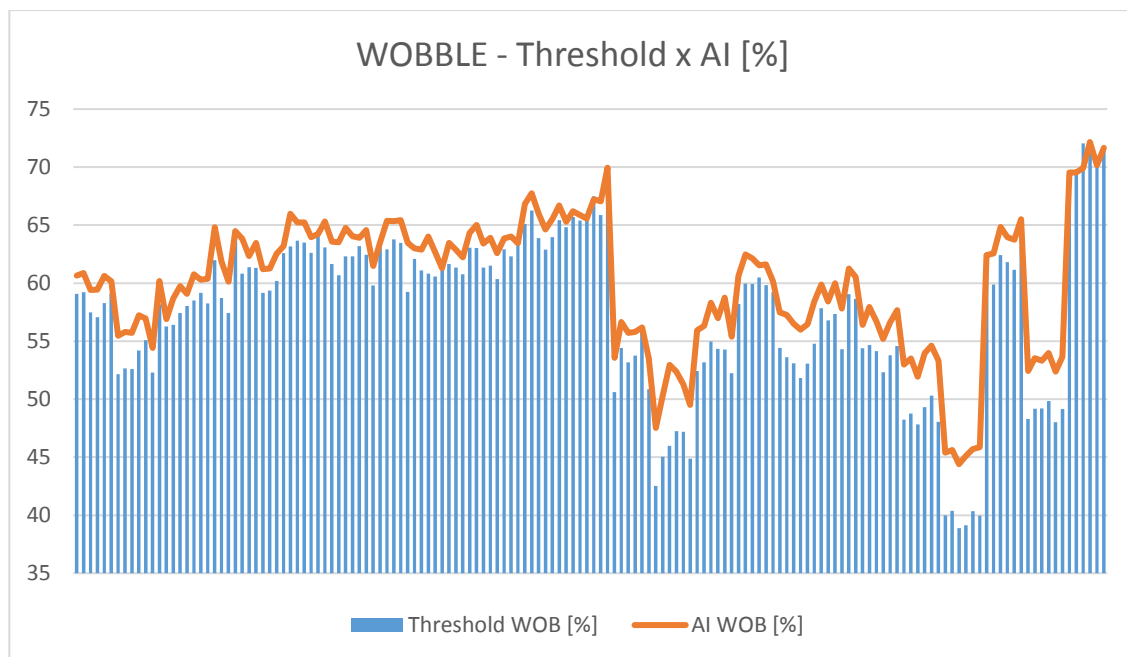
P-hodnota vypočítaná párovým t-testem byla pro linearitu ($p = 0,277$) vyšší než zvolená hladina významnosti ($p < 0,01$), tj. mezi AI a SpermMotility metodami pro analýzu linearity neexistuje statisticky významný rozdíl.



Graf 8: Porovnání výsledků přímosti (*straightness*) pomocí SpermMotility tasku (*threshold*) a trackingu pomocí umělé inteligence (AI). STR = přímost ($VSL/VAP \cdot 100$).

Průměrná hodnota přímosti vypočítaná při AI analýze byla nižší než při konvenční metodě analýzy pomocí SpermMotility tasku.

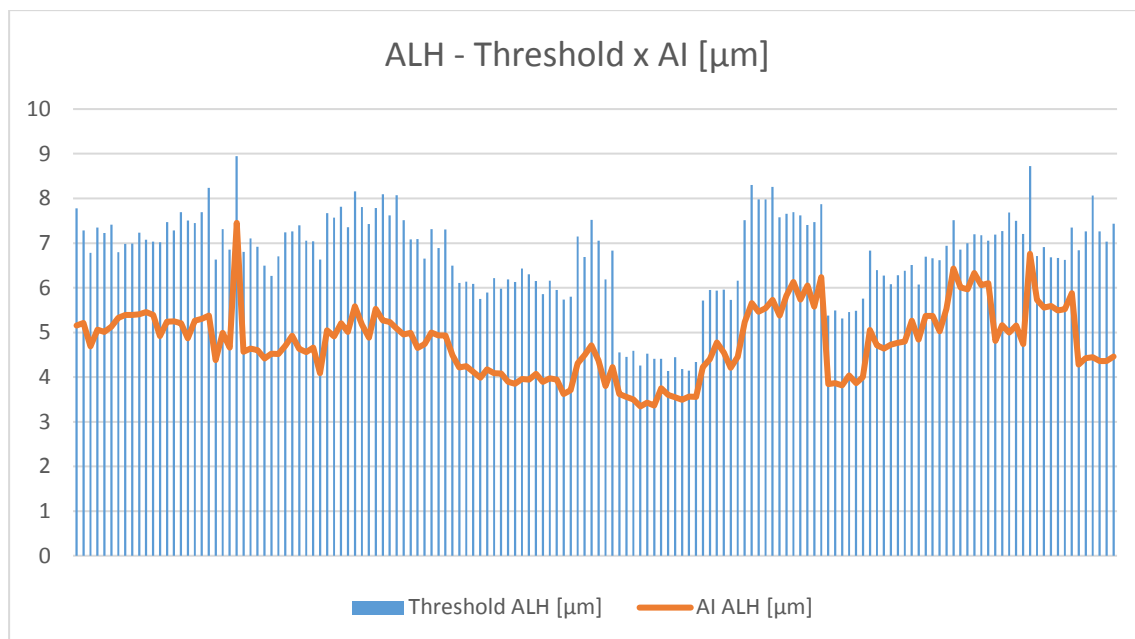
P-hodnota vypočítaná párovým t-testem byla pro přímost ($p = 0,000$) nižší než zvolená hladina významnosti ($p < 0,01$), tj. mezi AI a SpermMotility metodami pro analýzu přímosti existuje statisticky významný rozdíl.



Graf 9: Porovnání výsledků Wobble koeficientu pomocí SpermMotility tasku (*threshold*) a trackingu pomocí umělé inteligence (AI). WOB = kymácivost hlavičky (wobble).

Průměrná hodnota Wobble koeficientu vyhodnocená při AI analýze byla vyšší než při konvenční metodě analýzy pomocí SpermMotility tasku.

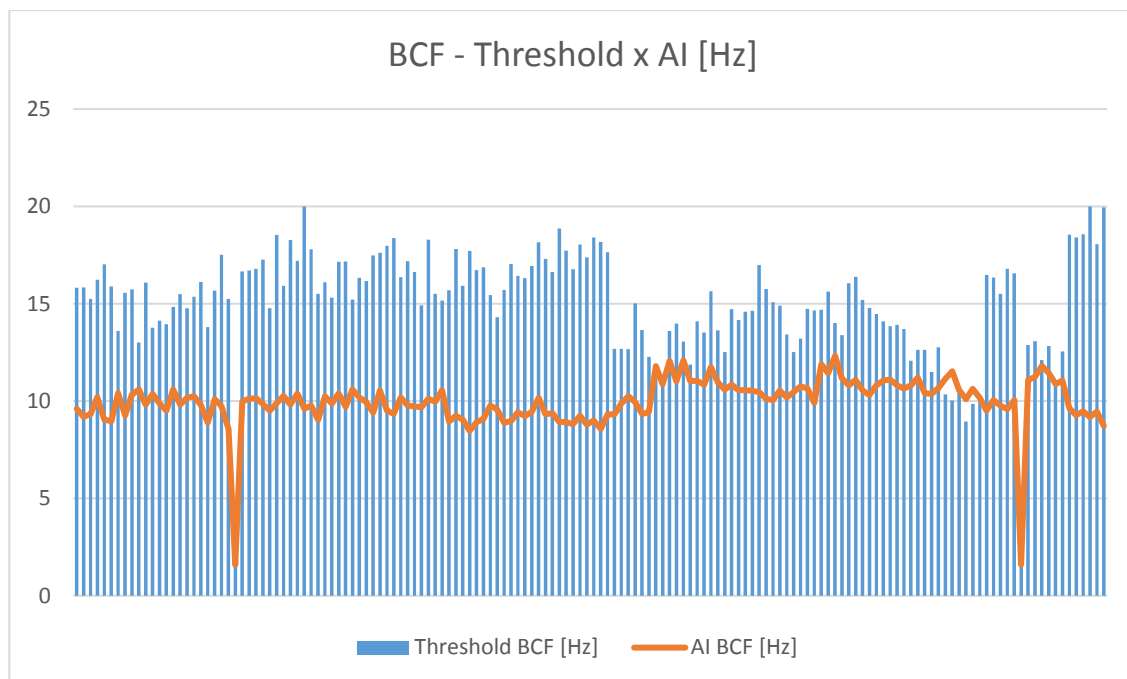
P-hodnota vypočítaná párovým t-testem byla pro Wobble koeficient ($p = 0,001$) nižší než zvolená hladina významnosti ($p < 0,01$), tj. mezi AI a SpermMotility metodami pro analýzu Wobble koeficientu existuje statisticky významný rozdíl.



Graf 10: Porovnání výsledků amplitudy laterálního vybočení hlavičky pomocí SpermMotility tasku (threshold) a trackingu pomocí umělé inteligence (AI). ALH = amplituda laterálního vybočení hlavičky (*amplitude of lateral head displacement*).

Průměrná hodnota kinematického parametru ALH vypočítaná při AI analýze byla nižší než při konvenční metodě analýzy pomocí SpermMotility tasku.

P-hodnota vypočítaná párovým t-testem byla pro amplitudu laterálního vybočení hlavičky ($p = 0,000$) nižší než zvolená hladina významnosti ($p < 0,01$), tj. mezi AI a SpermMotility metodami pro analýzu ALH existuje statisticky významný rozdíl.



Graf 11: Porovnání výsledků frekvence křížení pomocí SpermMotility tasku (*threshold*) a trackingu pomocí umělé inteligence (AI). BCF = frekvence křížení (*beat-cross frequency*).

Průměrná hodnota kinematického parametru BCF vypočítaná při AI analýze byla nižší než při konvenční metodě analýzy pomocí SpermMotility tasku.

P-hodnota vypočítaná párovým t-testem byla pro frekvenci křížení ($p = 0,000$) nižší než zvolená hladina významnosti ($p < 0,01$), tj. mezi AI a SpermMotility metodami pro analýzu BCF existuje statisticky významný rozdíl.

6 Diskuze

Cílem diplomové práce bylo stanovit, zda existuje významný rozdíl mezi konvenčním postupem prahování a detekce objektů (spermií) pro analýzu jejich motility a novým přístupem využívajícím algoritmy umělé inteligence.

Motilita je obvykle závislá na funkční struktuře spermií, a tak je považována za jeden z vhodných indikátorů při hodnocení kvality ejakulátu v souvislosti s fertilizačním potenciálem spermie (Feitsma et al. 2011) a úspěšným embryonálním vývojem (Shulman et al. 1998). Subjektivní hodnocení motility spermií je závislé především na individuálních schopnostech a zkušenostech laboratorního technika, což často vede k velmi rozdílným výsledkům. Iquer-Ouada & Verstegen (2001) ve své práci publikovali, že mezi subjektivním hodnocením stejného ejakulátu různými laboratorními techniky existuje variabilita 30-60 %. Proto je dnes již patrný nárůst využívání CASA systémů i mimo vědecké laboratoře, v laboratořích klinických (inseminační stanice, reprodukční centra) (Valverde et al. 2019).

CASA neboli počítačem řízená analýza spermií představuje praktický nástroj, který poskytuje rychlé a objektivnější posouzení ejakulátu s vyšší mírou standardizovatelnosti výsledků. S technickým pokrokem se rozvíjí možnosti kvantitativních analýz pro predikci fertilizačního potenciálu odebraného ejakulátu. Proto je nezbytné zajistit přesné a standardizované hodnocení kinematických parametrů (Amann & Katz 2004). Pro přesnou analýzu je zcela nezbytné zajistit korektní identifikaci spermií, respektive jejich hlaviček, a také přesné a standardizované hodnocení kinematických parametrů. Jelikož jsou CASA softwary vyvíjeny několika různými firmami, liší se v použitých algoritmech pro rekonstrukce trajektorií, což výrazně komplikuje proces standardizace. Segmentace spermií, tj. proces, který dělí obraz na části a umožňuje separovat objekty v obrazu (Kizrak 2019), je u většiny CASA systémů založena na principu prahování (*threshold*). Konvenční metoda prahování se však často setkává s problémy v podobě chybné detekce nespermatických částic a ztráty některých spermií v důsledku kolizí či překrývání spermií (Mortimer et al. 2015). Možným řešením těchto problémů by mohla být implementace hlubokých neuronových sítí.

Neuronové sítě jsou nástroje umělé inteligence, které jsou inspirovány fungováním lidského mozku. Nejvýznamnější vlastností neuronových sítí je jejich schopnost učit se, a tak nachází široké uplatnění v rozličných oborech, například při detekci objektů, rozpoznávání obličejů, při řízení autonomních automobilů apod. (LeCun et al. 2015). V rámci své diplomové práce jsem využívala CASA software NIS-Elements (Laboratory Imaging s.r.o., Praha, ČR). Pro implementaci umělé inteligence byla IT odborníky z Laboratory Imaging s.r.o. doporučena neuronová síť typu U-Net. Je to plně konvoluční síť vyvinutá týmem Ronneberger et al. (2015) pro biomedicínskou obrazovou segmentaci, jako je např. zobrazení struktur tkání, detekce tumorů, a proto se její použití nabízelo i při detekci spermií. Síť U-Net je zcela unikátní svou enkodér-dekodér strukturou, která umožňuje přesnou lokalizaci detekovaného objektu (Lamba 2019). Celkem obsahuje 23 konvolučních vrstev a její architektura je modifikována tak, že k jejímu natrénování stačí jen pár desítek tréninkových souborů (Ronneberger et al. 2015). Síť U-Net se učí pomocí adaptačního učení s učitelem (tzv. *supervised learning*), kdy se síti při učení poskytuje vzor s očekávaným výstupem, tj. v našem případě zpracované snímky s manuálně označenými hlavičkami spermií. Síť se učí tak, že si na základě tréninkového datasetu upravuje jednotlivé hodnoty vah a biasu aktivační funkce, aby byly výsledky v další

iteraci přesnější (Nielsen 2018). V našem případě byl pro výpočet korekce použit adaptační algoritmus zpětného šíření chyby backpropagation.

Skutečnost, že se síť U-Net učí z poskytnutých tréninkových dat (tzv. *ground truth*) může být jak výhodou, tak zároveň i nevýhodou v případě, že by data nebyla dostatečně reprezentativní pro danou úlohu a manuální označení objektů by bylo nekonzistentní a málo kvalitní. *Ground truth* reprezentuje absolutní pravdu a měl by být přesným obrazem skutečnosti. Vytvořit takto kvalitní tréninkový dataset je však u snímků spermií velmi náročné. I přes odborné zpracování je zde stále velký vliv subjektivity a není možné ověřit realitu tak, jako například u snímků používaných na detekci tumorů, kde lze skutečnost ověřit biopsií (Özdemir et al. 2009). Problematická je především segmentace dotýkajících a překrývajících se buněk, kdy může být i pro vyškoleného odborníka náročné přesně označit hranice daného objektu. Segmentace obrazu může být problematická také u nekvalitních snímků s nízkým rozlišením.

V souvislosti s pokrokem v oblasti informačních technologií, byly v posledních letech již provedeny pokusy o implementaci umělé inteligence (AI) i do nástrojů využívaných v oblasti reprodukčních biotechnologií. Několik jich bylo představeno v roce 2018 na konferencích ESHRE (*European Society of Human Reproduction and Embryology*) a ASRM (*American Society for Reproductive Medicine*). Většina z nich byla zaměřena na selekci embryí pomocí umělé inteligence (Curchoe & Bormann 2019) nebo na predikci infertility mužů na základě jejich životního stylu (Gil et al. 2012). Tým Thirumalaraju et al. (2018) vyvinul software na analýzu lidských spermií s natrénovanou hlubokou konvoluční neuronovou sítí. Jejich konvoluční síť při testování oproti *ground truth* správně identifikovala 371 spermií z 415, tj. její úspěšnost při predikci byla 89 %. Dále udává, že při analýze 9 vzorků vykazovala síť 100% přesnost výsledků v identifikaci všech normálních i abnormálních vzorků.

Výsledky této diplomové práce ukázaly, že při segmentaci býčích spermií byla námi natrénovaná síť U-Net velmi úspěšná. Z celkového počtu 14 765 dokázala správně segmentovat 13 655 spermií, tj. 92,48 %, což je více, než ve své práci zmiňuje Thirumalaraju et al. (2018), a také více než je úspěšnost konvenční metody prahování, kdy procento správně identifikovaných spermií činilo pouze 79,45 %. Také v počtu *false positive* (FP, objekty chybně identifikovány jako spermie) a *false negative* (FN, chybně neidentifikované objekty) vykazuje U-Net lepší výsledky než konvenční metoda prahování. Z hodnot *precision*, *recall* a F1, které se běžně využívají pro hodnocení metod souvisejících s identifikací objektů a poukazují na přesnost a efektivnost natrénované sítě, je zřejmé, že AI byla při segmentaci spermií úspěšnější než konvenční metoda prahování. Oproti tomu, při segmentaci býčích spermií ve standardně používaném ředidle pro kryokonzervaci spermií býků AndroMed® dosahovala síť výrazně horších výsledků než při segmentaci standardních vzorků ředěných v Sp-TALP používaným pro *in vitro* manipulaci a analýzu. Z celkové počtu 149 dokázala síť správně detekovat 70 spermií, tj. 46,98 %. Příčinou je pravděpodobně velmi specifická mozaikovitá kresba, která na snímcích tímto ředidlem vznikla. Velké množství spermií na snímcích splývalo s ředidlem, což velmi komplikovalo vytvoření dostatečně kvalitních tréninkových vzorů. Jak je vidět z podílu *false negative* ($n = 79$) z celkového počtu ($n = 149$), síť více než polovinu spermií z předložených snímků vůbec nedokázala identifikovat. Tomu odpovídá i hodnota *recall*, která je velmi nízká (0,470).

Pro rozšíření aplikovatelnosti softwaru pro různé druhy hospodářských zvířat byly experimenty s býčími spermii doplněny o další druhy. V budoucnu by bylo vhodné rozšířit software o dovednost automatické detekce a rozlišování druhu ejakulátu na základě naučených zkušeností bez nutnosti manuální specifikace živočišného druhu.

Protože měl software při AI segmentaci problémy při rozdělování překrývajících se spermií, byla při segmentaci koncentrovanějších vzorků kozlích a kohoutích spermií dodatečně využita v nastavení NIS-Elements funkce „*Object separate bright*“, která vylepšuje schopnost sítě rozlišovat překrývajících se spermií. Tato funkce je v General Analysis 3 rozdělena do dvou kroků *Separate Objects* a *Separate Bright*. Při *Separate Objects* rozděluje software objekty pomocí morfologické analýzy a pracuje pouze s informací v binárním zobrazení. *Separate Bright* funguje podobně, ale kromě tvaru bere v úvahu také intenzitu jasu v každém pixelu objektu. V případech, kdy není možné z tvaru poznat, že se jedná o více objektů, se může stát, že je mezi objekty viditelná nepatrná hrana s odlišnou intenzitou pixelů, díky které je možné pomocí funkce *Separate Bright* objekty oddělit.

Z exportovaných výsledků TP, FP a FN kozlích spermií vyplývá, že využití této doplňující separační funkce mělo pozitivní vliv na úspěšnost segmentace, což je důležité pro další experimentální práce a možnou translaci do klinické praxe. Při AI segmentaci se zapnutou funkcí „*Object separate bright*“ bylo správně detekováno 1 228 z 1 493 spermií, tj. 82,25 %, zatímco bez této funkce bylo úspěšně detekováno 73,61 %. Celková efektivnost AI s funkcí „*Object separate bright*“ při predikci kozlích spermií, vyjádřena skórem F1, byla rovna 0,871, což je více než při konvenční metodě prahování. Separační funkce by tak mohla být vhodnou modifikací pro další vývoj softwaru pro segmentaci vzorků s vyšší koncentrací spermií, spojenou se zvýšenou pravděpodobností překrývání spermií.

Také u kohoutích spermií byla pro natrénování sítě hodnocena funkce „*Object separate bright*“. Při detekci spermií hodnocené počtem TP, FP a FN vykazovala síť opět lepší výsledky se zapnutou separační funkcí (72,33 % oproti 65,29 % správně predikovaných spermií). Avšak z hodnoty *precision*, tj. schopnost sítě predikovat pouze požadované objekty, uvedené v tabulce 7, je patrné, že bez zapnuté separační funkce je přesnost výsledků vyšší. Při zapnuté separační funkci software často segmentoval objekty chybně – buď hlavičku rozsegmentoval na několik dílčích fragmentů, nebo naopak zahrnul více spermií dohromady. Příčinou horších výsledků sítě při segmentaci kohoutích spermií je pravděpodobně jejich odlišná morfologická stavba, kdy lze jen velmi obtížně odlišit hlavičku. Problémem byla také extrémní koncentrace vzorků, velký podíl překrývajících se hlaviček a křížení spermií (viz příloha 5).

Obecně lze porovnat úspěšnost segmentace dosažené pomocí neuronové sítě v této diplomové práci se studií Guerrero-Peña et al. (2018), který provedl obrazovou segmentaci pomocí U-Net na T-lymfocytech. Guerrero-Peña et al. (2018) rovněž popisuje, že největší problémy vykazovala U-Net při separaci shluků buněk. Jeho nejlepší dosažené výsledky při detekci T-lymfocytů pomocí U-Net byly *precision* = 0,755, *recall* = 0,646, F1 = 0,696. Až při rozšířeném značení dotýkajících se buněk dosahovala jeho modifikovaná U-Net síť lepších výsledků (*precision* = 0,822, *recall* = 0,857, F1 = 0,839). Dále uvádí, že segmentace dotýkajících nebo překrývajících se buněk je velmi problematická, protože dotýkající se okraje buňky mají často slabé, rozostřené hrany a neuniformní hodnoty jasu, což komplikuje segmentační postup. Také Mortimer (1997) a Ronneberger et al. (2015) se shodují, že největším problémem biomedicínské segmentace je především separace blízkých nebo překrývajících se

objektů. Toto se ukázalo být problémem i u segmentace pomocí NIS-Elements. Právě překrývání spermií, křížení jejich trajektorií a kolize se jeví jako jeden z největších problémů ovlivňujících správnost segmentace. Čím vyšší je koncentrace spermií, tím vyšší je riziko, že se prolnou místa s největším pravděpodobným výskytem dvou a více hlaviček, což vede k vzniku skutečných či zdánlivých kolizi, kdy spermie proplouvá příliš blízko jiného objektu. Některé softwary řeší kolize fragmentací trajektorie a následně takto zkrácený fragment vyloučí z analýzy. Při takové fragmentaci trajektorie dochází chybně k navýšení koncentrace i procentu progresivně motilních spermií (Mortimer 1997). V dnešní době již většina CASA softwarů disponuje chytrým korekčním algoritmem pro řešení kolizí. Způsob řešení kolizí pomocí korekčních algoritmů je zcela zásadní pro správný průběh analýzy (Bompart et al. 2018; Valverde et al. 2019). Například algoritmus NIS-Elements při rekonstrukci trajektorií po kolizi vždy preferuje objekt, který nejvíce odpovídá dosavadnímu vývoji trajektorie. Kolize dvou spermií však může vyústit v jejich vychýlení z původního směru a tím změně jejich trajektorie, která však již nebude softwarem správně zrekonstruována (Shi et al. 2006).

Pro korektní rekonstrukci trajektorií je zcela nezbytná přesná identifikace hlaviček. Aby byla spermie softwarem správně identifikována jako spermie, musí odpovídat předem uživatelsky zadaným parametrům, zvolených podle druhu spermie. Jakmile je hlavička identifikována, software vypočítá její polohu na souřadnicích [x; y] a určí centroid, který je používán pro další analýzy jako těžiště hlavičky (Mortimer 2000). V softwaru NIS-Elements bývá centroid vypočítán jako vážený průměr jednotlivých bodů objektu, které jsou vážené intenzitou jasu v daném bodě. Algoritmus pro výpočet centroidu je identický pro všechny verze NIS-Elements, včetně verzí s implementovanou neuronovou sítí. Ve chvíli, kdy jsou určeny centroidy všech hlaviček spermií, může být zahájena analýza dalších snímků, vedoucí k rekonstrukci trajektorie spermií. Na následujícím snímku hledá software hlavičku v kruhovitém prostoru kolem hlavičky, který je určen maximální vzdáleností, kterou je spermie pravděpodobně schopná urazit za daný čas. Zvolený rádius se obvykle liší podle živočišného druhu a použitého ředidla.

V případě, že spermie nejsou detekovány správně, nemohou být správné ani analýzy příslušných pohybových charakteristik. Vlivem nesprávné identifikace dochází k ovlivnění výsledků motility spermií ale i dalších parametrů, které je možno hodnotit jako např. koncentrace. V případě, že se dvě a více spermií vyskytuje příliš blízko u sebe, nebo poblíž jiných objektů, systém je často identifikuje jako jeden velký spojený objekt, který vyhodnotí jako příliš velký na to, aby ho klasifikoval jako hlavičku spermií, a proto je vyřadí z analýzy. Vyřazením těchto typicky nemotilních spermií, respektive neprogresivně motilních, se zvyšuje procento progresivně motilních spermií. Nemotilní spermie, stejně jako chybně identifikované cizí objekty podobné velikosti, mohou být rozpořehovány pohybem bičíku okolních spermií, a tak nesprávně klasifikovány jako motilní a chybně navyšovat zdánlivý počet motilních spermií (Mortimer et al. 2015).

Vzhledem k uspokojivým výsledkům sítě při segmentaci býčích spermií, jsme se rozhodli využít umělé inteligence pro následné hodnocení procentuální motility a kinematických parametrů motility spermií.

Z výsledků ($p < 0,01$) vyplývá, že u kinematických parametrů MOT, PMOT, LIN, VAP, VSL a VCL neexistuje statisticky významný rozdíl mezi konvenční a AI analýzou motility. Naopak, u parametrů STR, ALH, BCF a WOB existuje signifikantní rozdíl mezi konvenční

SpermMotility analýzou a trackingem vypracovaným implementovanou neuronovou sítí, což by se do budoucna mohlo jevit jako vhodná modifikace softwaru pro preciznější hodnocení hyperaktivovaného stavu spermií.

Procento celkově motilních spermií při AI analýze bylo vyšší než při konvenčním způsobu. To je pravděpodobně zapříčiněno faktem, že při segmentaci pomocí hlubokých neuronových sítí byl software přesnější při identifikaci relevantních objektů než konvenční metoda prahování, kdy byly jako spermie identifikovány i cizí částice ve vzorku. Takto chybně navýšené množství detekovaných objektů může v některých případech uměle navýšit koncentraci a snížit procento motilních spermií.

Výsledky naší studie ukazují, že průměrné hodnoty kinematických parametrů ALH a BCF vypočítané při AI analýze byly signifikantně nižší než při konvenčním způsobu analýzy. Bylo provedeno několik studií (Akashi et al. 2010; Boryshpolets et al. 2013; Amann & Waberski 2014; Giaretta et al. 2017; Bompert et al. 2018) porovnávajících výsledky analýz z různých CASA softwarů, ze kterých vyplývá, že parametry ALH a BCF jsou nejcitlivější na zvolený algoritmus softwaru. Mortimer & Swan (1999) uvádí, že hodnoty pohybových parametrů, jako jsou například VAP, ALH a BCF, jsou vypočítány po vyhlazení trajektorie spermií a jsou snadno ovlivnitelné vyhlazovacími algoritmy. To znamená, že pro stejnou trajektorii lze při hodnocení různými CASA systémy získat velice rozdílné výsledky kinematických parametrů. Což se ukázalo i v naší práci, kdy se u parametrů ALH, BCF, STR a WOB projevil signifikantní rozdíl mezi konvenční metodou pohybové analýzy a AI trackingem. Standardizace je však v tomto případě obtížná, protože neexistuje žádné standardní kritérium, které by určovalo, která hodnota parametru je správná.

Přesnost pohybových analýz ovlivňuje řada faktorů. Přestože všechny CASA systémy pracují na stejném či velmi podobném principu, ve skutečnosti se velmi liší v použité optice, hardwaru, a především v algoritmech pro identifikaci spermií a rekonstrukce trajektorií (Verstegen et al. 2002; Björndahl et al. 2010; Bompert et al. 2018; Soler et al. 2018).

Jako optimální hloubka počítací komůrky pro snímání v CASA se jeví 10 μm (Makler) až 20 μm (Leja), ale může omezit přirozený pohyb spermií (Amann & Waberski 2014). Při použití hlubších komůrek dochází k problémům při zobrazování spermií, které se pohybují v různých hloubkách ostrosti. U komůrek typu Makler, kterou jsme používali i v naší práci, existuje riziko chybných výsledků při jejich opětovném používání a nedokonalém vyčištění.

Pro CASA analýzu se obvykle doporučuje koncentrace nižší než $50 \times 10^6/\text{ml}$ (Contri et al. 2010, WHO 2010). V případě našich analýz byla koncentrace vzorků spermií býků $20 \times 10^6/\text{ml}$. U vzorků spermií kozlů a kohoutů byly vybrány takové, které překračovaly doporučenou mez ($60 - 80 \times 10^6/\text{ml}$). Při vysoké koncentraci se zvyšuje riziko chybných výsledků v důsledku častějšího křížení trajektorií a kolizí (Mortimer 2000). Z našich výsledků je však patrné, že i přes vyšší koncentraci vzorků kozlího ejakulátu fungovala neuronová síť po zapojení přídatné separační funkce velmi dobře a při segmentaci byla úspěšnější než konvenční metoda.

Snímací frekvence (FR) určuje kvalitu nasnímaných dat a ovlivňuje detailnost vykreslení trajektorie, což má efekt na skutečnou délku trajektorie (Amann & Waberski 2014). Do nedávna byly CASA systémy limitovány snímací frekvencí do 60 Hz (Holt et al. 2007; Contri et al. 2010; Lu et al. 2014). V dnešní době se již objevují kamery se snímací frekvencí vyšší než 200 Hz (Valverde et al. 2019), což může významně pozměnit hodnoty kinematických parametrů oproti studiím z předchozích let (Castellini et al. 2011; Bompert et al. 2018). Mortimer & Swan

(1999) ve své práci upozorňují, že při používání příliš nízké frekvence (<50 Hz) není možné získat přesné výpočty „reálné“ dráhy spermie, což vede k nepřesnostem v dalších analýzách (Bompart et al. 2018). Mezi nejcitlivější parametry na hodnotu snímací frekvence se řadí VCL a BCF. Valverde et al. (2019) ve své práci uvádí, že při zvýšení FR z 25 na 200 Hz, se u parametru BCF projevuje nárůst až o 374 %, u parametru VCL o 176,8 %. Castellini et al. (2011) pozoroval při změně snímací frekvence z 12 na 200 Hz u parametru BCF desetinásobný nárůst, u VCL čtyřnásobný.

Protože schopnost pohybu spermie hraje důležitou roli při průchodu samičím reprodukčním traktem a oplození vajíčka, bývá motilita klíčovým parametrem pro zařazování plemeníků do chovu (Quintero-Moreno et al. 2004). Oliveira et al. (2013) zjistil, že procento celkově motilních spermií (TMOT) má tendence být vyšší u vysoce plodných býků. Muino et al. (2008) uvádí, že spermie s vyšším procentem progresivně motilních spermií mají větší fertilizační potenciál, protože špatně pohyblivé, pomalé spermie pravděpodobně nebudou schopny dosáhnout oviduktu, kde dochází k oplození. Také Gillian et al. (2008) potvrzuje korelaci PMOT s fertilitou *in vitro*, a navíc dodává také korelaci s parametrem VSL.

De Geyter et al. (1998) ve své studii pozoroval souvislost mezi křivočarou rychlostí (VCL) a fertilizačním potenciálem spermií a uvádí, že spermie s vyšší hodnotou VCL vykazovali vyšší úspěšnost při inseminaci a považuje VCL za parametr s nejvýraznějším vlivem na úspěšnost *in vitro* oplození. Kathiravan et al. (2011) v souvislosti s fertilizačním potenciálem uvádí, že při hodnotě VCL >70 $\mu\text{m/s}$, spolu s parametrem ALH >7 μm a sníženou linearitou, lze spermie označit jako hyperaktivované. V případě AI-CASA softwaru by byla možná identifikace hyperaktivovaných spermií prostřednictvím algoritmů s určenou prahovou hodnotou pro parametry ALH, VCL a LIN.

Kathiravan et al. (2011) uvádí, že z parametrů udávajících rychlost spermie, je hodnota VCL vždy nejvyšší a hodnota VSL vždy nejnižší, což odpovídá výsledkům našeho měření. Lu et al. (2014) uvádí, že v případě, že se spermie pohybuje pravidelně, hodnota VAP je téměř identická s hodnotou VSL. Avšak v případě nepravidelného pohybu bývá hodnota VAP vyšší než VSL, čemuž odpovídají i výsledky této diplomové práce. VAP parametr významně ovlivňuje další odvozené parametry, jako je STR, WOB, ALH či BCF (Lu et al. 2014).

ALH je důležitý parametr pro hodnocení schopnosti spermie projít cervikálním hlenem a fúzovat s vajíčkem (Verstegen et al. 2002). Mortimer (1997) uvádí, že trajektorie s relativně nízkou hodnotou ALH obvykle vykazují vysokou hodnotu linearitu. I tento fakt se naším měřením potvrdil.

Farrell et al. (1998) zkoumal v souvislosti s *in vitro* fertilitou různé kombinace kinematických parametrů. Kombinace PMOT, ALH, BCF, VAP vykazovala silnou korelaci ($r^2=0,87$), kombinace ALH, BCF, LIN, VAP a VSL dokonce ještě vyšší korelaci ($r^2=0,98$). Fertilitu však ovlivňují i jiné aspekty týkající se morfologie a funkčních vlastností ejakulátu. Sellem et al. (2015) ve své studii porovnává různé modely určené pro predikci plodnosti. Při použití CASA modelu (hodnocení morfologie a motility na základě VSL, ALH a PMOT) vypočítal korelaci na $r^2=0,24$. Při rozšíření CASA modelu o průtokovou cytometrii (hodnocení oxidace, akrosomální integrity, kompaktnosti DNA, mitochondriální aktivity a viability) byla prediktivnost plodnosti u modelu vyšší ($r^2=0,40$). Z výsledků Sellem et al. (2015) vyplývá, že pro predikci fertilizačního potenciálu spermií je vhodné kombinovat CASA systémy ještě s jinými metodami pro hodnocení ejakulátu.

7 Závěr

V rámci své diplomové práce jsem zjišťovala, zda implementace hlubokých neuronových sítí napomůže zlepšení detekce spermií v CASA softwaru NIS-Elements, který je již několik let používán v laboratořích Katedry veterinárních disciplín na Fakultě agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů ČZU.

Předkládaná diplomová práce ukazuje, že implementace umělé inteligence do CASA systémů by mohla být vhodným krokem vedoucím k vylepšení počítačově řízených analýz kvality ejakulátu. Avšak stále je zde velký prostor pro vylepšení, především v identifikaci překrývajících se spermií, spermií se specifickou morfologickou stavbou či v ředidlech obsahujících částice podobné spermiím.

Výsledky diplomové práce ukázaly na výborných výsledcích segmentace býčích spermií (Sp-TALP), že použitá neuronová síť U-Net byla vhodně zvolená pro tento typ obrazové segmentace, a časem může být výborným nástrojem například i pro klinickou praxi. Při zpracování spermií jiných druhů (kozel a kohout) byly záměrně vybrány vzorky s vyšší koncentrací buněk (suboptimální podmínka z hlediska hodnocení CASA). Dle očekávání byla při segmentaci vzorků spermií kozlů a kohoutů efektivnost neuronové sítě nižší než u vzorků býků. Ovšem z naměřených hodnot bylo zjištěno, že při použití funkce NIS-Elements „*Object separate bright*“ vykazovala síť lepší výsledky v detekci spermií než bez této separační funkce.

V budoucnu by se vývojáři NIS-Elements měli zaměřit na preciznost detekce kolidujících spermií a zdokonalit software tak, aby dokázal identifikovat spermie i v suboptimálních podmínkách (viz mozaikovitá kresba na snímcích při ředění AndroMed®) nebo druhově odlišný tvar hlavičky spermie (např. kohouti, u kterých je obtížné jednoznačně odlišit hlavičku od zbytku spermie). Protože správná identifikace hlavičky spermie, je zcela zásadní pro vypracování analýz kinematických parametrů i výpočet jejich koncentrace.

Využití neuronových sítí by mohlo být také správným krokem pro standardizaci CASA systémů. Pro efektivní a přesné výsledky analýz, by mohl být pro CASA softwary s implementovanou umělou inteligencí vytvořen jednotný standardní tréninkový dataset vytvořený skupinou odborníků, který by se plošně využíval pro trénování neuronových sítí v různých CASA softwarech. Tímto způsobem by bylo možné provádět kontroly kvality v rámci jedné laboratoře a zároveň porovnávat výsledky mezi různými laboratořemi. Dalším testováním na větším datasetu by dále bylo možné využívat modifikovaný CASA systém pro preciznější analýzu hyperaktivace spermií v kapacitačních podmínkách nebo stanovení reakce spermií například na cizorodé látky v rámci toxikologických výzkumů.

Předkládaná diplomová práce poskytuje ucelený protokol a může být podkladem pro další experimentální činnost i praktickou aplikaci.

8 Literatura

- Akashi T, Watanabe A, Komiva A, Fuse H. 2010. Evaluation of the sperm motility analyser system (SMAS) for the assessment of sperm quality in infertile men. *Systems biology in reproductive medicine* **56**(6): 473-477.
- Alberts B. 1998. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. Espero, Ústí nad Labem.
- Alquizar-Baeta C, Gimeno-Martos S, Miguel-Jiménez S, Santolaria P, Yániz J, Palacín I, Casao A, Celebrián-Pérez JA, Muino-Blanco T, Pérez-Pé R. 2019. OpenCASA: A new open-source and scalable tool for sperm quality analysis. *PLoS computational biology* **15** (e1006691) DOI: 10.1371/journal.pcbi.1006691.
- Amann RP, Katz DF. 2004. Reflections on CASA after 25 years. *Journal of Andrology* **25**(3): 317-325.
- Amann RP, Waberski D. 2014. Computer-assisted sperm analysis (CASA): capabilities and potential developments. *Theriogenology* **81**: 5-17.
- Anderson D, McNeill G. 1992. *Artificial Neural Networks Technology*. Kaman Science Corporation, New York.
- Atibi M, Bennis A, Boussaa M. 2014. Precise calculation unit based on a hardware implementation of a formal neuron in a FPGA platform. *International Journal of Advances in Engineering & Technology* **7**(3): 733.
- Bengio Y. 2009. Learning deep architectures for AI. *Foundations and trends® in Machine Learning* **2**(1): 1-127.
- Berns GS, Berns MW. 1982. Computer-based tracking of living cells. *Experimental Cell Research* **142**(1): 103-109.
- Berruti G, Paiardi C. 2011. Acrosome biogenesis: Revisiting old questions to yield new insights. *Spermatogenesis* **1**: 95-98.
- Björndahl L, Mortimer D, Barratt ChLR, Castilla JA, Menkveld R, Alvarez JG, Haugen TB. 2010. *A Practical Guide to Basic Laboratory Andrology*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Bompart D, Garcia-Molina A, Ververde A, Caldeira C, Yaniz J, Nunez de Murga M, Soler C. 2018. CASA-Mot technology: How results are affected by the frame rate and counting chambre. *Reproduction Fertility and Development* **30**: 810-819.
- Bompart D, Vázquez RF, Gómez R, Valverde A, Roldán ARS, García-Molina A, Soler C. 2019. Combined effects of type and depth of counting chambre, and rate of image frame capture, on bull sperm motility and kinematic. *Animal Reproduction Science* **209**: 106169.
- Boryshpolets S, Kowalski RK, Dietrich GJ, Dzyuba B, Ciereszko A. 2013. Different computer-assisted sperm analysis (CASA) systems highly influence sperm motility parameters. *Theriogenology* **80**: 758-765.
- Boyers SP, Davis RO, Katz DF. 1989. Automated semen analysis. *Current Problems in Obstetrics Gynecology and Fertility* **12**: 167-200.
- Brazil C. 2010. Practical semen analysis: from A to Z. *Asian Journal of Andrology* **12**: 14-20.
- Budworth PR, Amann RP, Hamerstedt RH. 1987. A microcomputer-photographic method for evaluation of motility and velocity in bull sperm. *Journal of Dairy Science* **70**: 1927-1936.

- Cai J, Zeng Y, Song C, Mo ML, Yin B, Lin Q, Huang J. 2009. Quality evaluation of 3 sperm counting chambers by computer-assisted sperm analysis system. *National Journal of Andrology* **15**: 241-243.
- Castellini C, Dal Bosco A, Ruggeri S, Collodel G. 2011. What is the best frame rate for evaluation of sperm motility in different species by computer-assisted sperm analysis? *Fertility and Sterility* **96**: 24-27.
- Clermont Y, Einberg E, Leblond CP, Wagner S. 1955. The perforatorium – an extension of the nuclear membrane of the rat spermatozoon. *The Anatomical Record* **121**(1): 1-12.
- Contri A, Valorz C, Faustini M, Wegher L, Carluccio A. 2010. Effect of semen preparation on CASA motility results in cryopreserved bull spermatozoa. *Theriogenology* **74**(3): 424-435.
- Cummins JM, Woodall PF. 1985. On mammalian sperm dimension. *Journal of Reproduction & Fertility* **75**: 153-175.
- Curchoe CL, Bormann CL. 2019. Artificial intelligence and machine learning for human reproduction and embryology presented at ASRM and ESHRE 2018. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **36**(4): 591-600.
- Čápka D. 2016. Úvod do teorie algoritmů. IT Network, Praha. Available from: <https://www.itnetwork.cz/navrh/algoritmy/teorie/uvod-do-teorie-algoritmu-definice-casova-slozitost-stabilita/> (accessed May 2020).
- De Geyter CH, De Geyter M, Koppers B, Nieschlag E. 1998. Diagnostic accuracy of computer-assisted sperm motion analysis. *Human reproduction (Oxford, England)* **13**(9): 2512-2520.
- DeJonge CJ, Barratt CLR. 2006. *The Sperm Cell: Production, Maturation, Fertilization, Regeneration*. Cambridge University Press, New York.
- Douglas-Hamilton DH, Smith NG, Kuster CE, Vermeiden JPW, Althouse GC. 2005. Particle distribution in low-volume capillary-loaded chambers. *Journal of Andrology* **26**(1): 107-114.
- Dvořáková K, Moore HD, Šebková N, Paleček J. 2005. Cytoskeleton localization in the sperm head prior to fertilization. *Reproduction* **130**: 61-69.
- Eddy EM. 2006. The spermatozoon. *Knobil and Neill's physiology of reproduction* **1**: 3-54.
- Estrada FJ, Jepson AD. 2009. Benchmarking image segmentation algorithms. *International Journal of Computer Vision* **85**(2): 167-181.
- Farrell PB, Presicce GA, Brockett CC, Foote RH. 1998. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. *Theriogenology* **49**(4): 871-879.
- Feitsma H, Broekhuijse MLWJ, Gadella BM. 2011. Do CASA systems satisfy consumers demands? A critical analysis. *Reproduction in Domestic Animals* **46**: 49-51.
- Fraser N. 1998. *The biological neuron*. Virtual Ventures-Home, Ottawa. Available from <http://vv.carleton.ca/~neil/neural/neuron-a.html> (accessed October 2019).
- Gaffney EA, Gadêlha H, Smith DJ, Blake JR, Kirkman-Brown JC. 2011. Mammalian sperm motility: observation and theory. *Annual Review of Fluid Mechanics* **43**: 501-528.
- Gamčík P, Kozumplík J, Mesároš P, Schvarc F, Vlček Z, Zibrín M. 1992. *Andrológia a umelá inseminácia hospodárskych zvierat*, Nakladateľstvo Príroda, Bratislava.
- Garrett C, Liu DY, Clarke GN, Rushford DD, Baker HW. 2003. Automated semen analysis: „zona pellucida preferred“ sperm morphometry and straight-line velocity are related to pregnancy rate in subfertile couples. *Human Reproduction* **18**: 1643-1649.

- Ge YF, Wang CH, Shao Y, Yao B, Wu D, Xia XY, Shang XJ, Huang YF. 2008. Comparison of the parameters obtained by sperm quality analyzer V and computer-aided sperm analysis system. *National Journal of Andrology* **14**(10): 923-926.
- Gerhenson C. 2013. *Artificial Neural Networks for Beginners*. Cornell University. Available from <http://arxiv.org/pdf/cs/0308031v1> (accessed November 2019).
- Giaretta E, Munerato M, Yeste M, Galeati G, Spinaci M, Tamanini C, Bucci D. 2017. Implementing an open-access CASA software for the assessment of stallion sperm motility: Relationship with other sperm quality parameters. *Animal reproduction science* **176**: 11-19.
- Gil D, Girela JL, De Juan J, Gomez-Torres MJ, Johnsson M. 2012. Predicting seminal quality with artificial intelligence methods. *Expert Systems with Applications* **39**(16): 12 564-573.
- Gillian L, Kroestsh T, Maxwell WM, Evans G. 2008. Assesment of in vitro sperm characteristics in relation to fertility in dairy bulls. *Animal Reproduction Science* **103**: 201-214.
- Goodfellow I, Bengio Y, Courville A. 2016. *Deep learning*. MIT Press book, Cambridge, USA.
- Guerrero-Peña FA, Fernandez PDM, Ren TI, Yui M, Rothenberg E, Cunha A. 2018. Multiclass weighted loss for instance segmentation of cluttered cells. 25th IEEE International Conference on Image Processing (ICIP).
- Hafez B, Hafez ESE. 2000. *Reproduction in Farm Animals*, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, USA.
- Hagan MT. 1996. *Neural network design*. Oklahoma State University, Stillwater.
- Hassim YMM, Ghazali R. 2012. Training a functional link neural network using an artificial bee colony for solving a classification problems. *arXiv preprint arXiv* **1212**:
- Haykin S. 2015. *Neural Networks: A Comprehensive Foundation*. Prentice Hall PTR, Upper Saddle River, USA.
- Hightower JA, Boockfor FR, Blake CA, Millette CF. 1999. The standard medical microscopic anatomy course: histology circa 1998. *The Anatomical Record: An Official Publication of the American Association of Anatomist* **257**(3): 96-101.
- Holt WV, O'Brien J, Abaigar T. 2007. Aplication and interpretation of computer-assisted sperm analyses and sperm sorting methods in assisted breeding and comparative research. *Reproduction, fertility and development* **19**(6): 709-718.
- Hönigschmid P. 2018. U-net, dropout, augmentation, stratification. TGS Salt Identification Challenge, Kaggle. Available from: <https://www.kaggle.com/phoenigs/u-net-dropout-augmentation-stratification> (accessed April 2020).
- Chang V, Garcia A, Hitschfeld N, Härtel S. 2017. Gold-standar for computer-assisted morphological sperm analysis. *Computers in biology and medicine* **83**: 143-150.
- Chatterjee RN. 2003. The evolution of sex determination pathway: Reasoning from drosophila. Presidential Address, Calcutta.
- Chudý J. 2020. Osobní emailová komunikace (NIS-Elements software) z 6. dubna 2020.
- Iguer-Ouada M, Verstegen JP. 2001. Evaluation of the „Hamilton-Thorn computer-based automated system“ for dog semen analysis. *Theriogenology* **55**: 733-749.
- Jin W, Chen S, Li H. 2004. Semen analysis of DNA fluorescence detection and two other routine analyzing methods. *National Journal of Andrology* **10**(7): 512-514.

- Johnson L, Blanchard TL, Varner D, Scrutchfield WL. 1997. Factors affecting spermatogenesis in the stallion. *Theriogenology* **48**(7): 1199-1216.
- Kathiravan P, Kalatharan J, Karthikeya G, Rengarajan K, Kardivel G. 2011. Objective sperm motion analysis to assess dairy bull fertility using computer-aided system – a review. *Reproduction in Domestic Animals* **46**(1): 165-172.
- Kizrak A. 2019. Deep Learning for Image Segmentation: U-Net Architecture. Heartbeat Fritz. Available from <https://heartbeat.fritz.ai/deep-learning-for-image-segmentation-u-net-architecture-ff17f6e4c1cf> (accessed April 2020).
- Koňarik J. 2015. Nervová soustava. ELUC – elektronická učebnice, Olomouc. Available from: <https://eluc.kr-olomoucky.cz/verejne/lekce/89> (accesses April 2020).
- Kraemer M, Fillion C, Martin-Pont B, Auger J. 1998. Factors influencing human sperm kinematic measurements by the celltrak computer-assisted sperm analysis system. *Human Reproduction* **13**: 611-619.
- Kriesel D. 2007. A Brief Introduction to Neural Networks, DKriesel, Rheinbach. Available from <http://dkriesel.com> (accessed November 2019).
- Krizhevsky A, Sutskever I, Hinton GE. 2012. Imagenet classification with deep convolutional neural networks. *Advances in neural information processing systems* **25**: 1097-1105.
- Kröse B, Van der Smagt P. 1993. An Introduction to Neural Networks. The University of Amsterdam, Amsterdam. Available from <http://infor.uva.es/~teodoro/neuro-intro.pdf> (accessed November 2019).
- Kuderjavý M. 2020. Osobní komunikace (NIS-Elements software) z 6. dubna 2020.
- Laboratory Imaging. 2020. NIS-Elements software. Laboratory Imaging s.r.o., Praha. Available from <http://lim.cz> (accessed May 2020).
- Lamba H. 2019. Understanding Semantic Segmentation with UNET. Towards Data Science. Available from <https://towardsdatascience.com/understanding-semantic-segmentation-with-unet-6be4f42d4b47> (accessed April 2020).
- Langmeier M, Kittnar O. 2011. Lékařská fyziologie. Grada, Praha.
- LeCun Y, Bengio Y, Hinton G. 2015. Deep Learning. *Nature* **521**(7553): 436-444.
- Lessner D. 2017. Co to je algoritmus. MFF UK, Praha. Available from: https://popelka.ms.mff.cuni.cz/~lessner/mw/index.php/U%C4%8Debnice/Algoritmus/Co_je_to_algoritmus (accessed May 2020).
- Lever J, Krzywinski M, Altman N. 2016. Points of significance: classification evaluation. *Nature Methods* **13**: 603-604.
- Lu JC, Huang YF, Lü NQ. 2014. Computer-aided sperm analysis: past, present and future. *Andrologia* **46**: 329-338.
- MathWorks. 2019. What is Deep Learning? The MathWorks, Inc., Natick. Available from <http://mathworks.com/discovery/deep-learning.html> (accessed November 2019).
- Martínez-Pastor F, Jorge Tizado E, Julian Garde J, Anel L, de Paz P. 2011. Statistical Series: Opportunities and challenges of sperm motility subpopulation analysis. *Theriogenology* **75**(5): 783-795.
- Marvan F, Hampl A, Hložánková E, Kresan J, Massanyi L, Vernerová E. 1992. Morfologie hospodářských zvířat. Česká zemědělská univerzita, Praha.

- Materna J. 2013. Deep Learning: budoucnost strojového učení? SBlog. Available from <http://fulltext.sblog.cz/2013/01/09/deep-learning-budoucnost-strojoveho-uceni/> (accessed November 2019).
- Mocé E, Grasseau I, Blesbois E. 2010. Cryoprotectant and freezing-process alter the ability of chicken sperm to acrosome react. *Animal Reproduction Science* **122**(3-4): 359-366.
- Mortimer D. 1990. Objective analysis of sperm motility and kinematics. Pages 97-133 in Keel BA, Webster BW, editors. *Handbook of the Laboratory Diagnosis and Treatment of Infertility*. CRC Press, Boca Raton.
- Mortimer ST. 1997. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Human Reproduction* **3**(5): 403-439.
- Mortimer ST. 2000. CASA – Practical Aspects. *Journal of Andrology* **21**(4): 515-524.
- Mortimer ST, Swan MA. 1999. Effects of image sampling frequency on established and smoothing-independent kinematic values of capacitating human spermatozoa. *Human Reproduction* **14**: 997-1004.
- Mortimer ST, van der Horst G, Mortimer D. 2015. The future of computer-aided sperm analysis. *Asian Journal of Andrology* **17**: 545-553.
- Muino R, Tamargo C, Hidalgo CO, Peña A. 2008. Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Holstein bulls: Effects of cryopreservation and between-bull variation. *Animal Reproduction Science* **109**(1-4): 27-39.
- Navlani A. 2019. Neural Network Models in R. DataCamp Community. Available from: <https://www.datacamp.com/community/tutorials/neural-network-models-r> (accessed May 2020).
- Neuwinger J, Behre HM, Nieschlag E. 1990. Computerized semen analysis with sperm tail detection. *Human Reproduction* **5**: 719-732.
- Nielsen MA. 2018. *Neural Networks and Deep Learning*. Determination Press, San Francisco, USA.
- Oliveira LZ, de Arruda RP, de Andrade AFC, Celeghini ECC, Reeb PD, Martins JPN, dos Santos RM, Beletti ME, Peres RFG, Monteiro FM, de Lima V. 2013. Assessment of in vitro sperm characteristics and their importance in the prediction of conception rate in a bovine timed-AI program. *Animal Reproduction Science* **137**(3-4): 145-155.
- Olson GE, Noland TD, Winfrey VP, Garbers DL. 1983. Substructure of the postacrosomal sheath of bovine spermatozoa. *Journal of Ultrastructure research* **85**(2): 204-218.
- Orel M. 2015. *Nervové buňky a jejich svět*. Grada, Praha.
- Owen DH, Katz DF. 1993. Sampling factors influencing accuracy of sperm kinematics analysis. *Journal of Andrology* **14**: 210-221.
- Özdemir B, Aksoy S, Eckert S, Pesaresi M, Ehrlich D. 2010. Performance measures for object detection evaluation. *Pattern Recognition Letters* **31**(10): 1128-1137.
- Parrish JJ, Susko-Parrish J, Winer MA, First NL. 1988. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biology of reproduction* **38**(5): 1171-1180.
- Pesch S, Bergmann M. 2006. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. *Micron* **37**: 597-612.
- Phadke AM. 2008. *Clinical Atlas of Sperm Morphology*, Tunbridge Wells, Anshan.

- Quintero-Moreno A, Miró J, Rigau AT, Rodríguez-Gil JE. 2003. Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. *Therionology* **59**: 1973-1990.
- Quintero-Moreno A, Rigau T, Rodríguez-Gil JE. 2004. Regression analyses and motile sperm subpopulation structure study as improving tools in boar semen quality analysis. *Therionology* **61**: 673-690.
- Ramió L, Rivera MM, Ramiréz A, Concha II, Peña A, Rigau T, Rodríguez-Gil JE. 2008. Dynamics of motile-sperm subpopulation structure in boar ejaculates subjected to „*in vitro*“ capacitation and further „*in vitro*“ acrosome reaction. *Therionology* **69**: 501-512.
- Reece WO. 2011. Fyziologie a funkční anatomie domácích zvířat. Grada, Praha.
- Rijsselaere T, van Soom A, Maed D, Nizanski W. 2012. Computer-Assisted Sperm Analysis in Dogs and Cats: An Update after 20 Years. *Reproduction in Domestic Animals* **47**: 204-207.
- Rikmenspoel R. 1965. The tail movement of bull spermatozoa: observations and model calculations. *Biophysical journal* **5**(4): 365-392.
- Ronneberger O, Fischer P, Brox T. 2015. U-net: Convolutional networks for biomedical image segmentation. International Conference on Medical image computing and computer-assisted intervention, Springer, Cham.
- Sellem E, Broekhuijse MLWJ, Chevrier L, Camugli S, Schmitt E, Schibler L, Koenen EPC. 2015. Use of combinations of *in vitro* quality assessments to predict fertility of bovine semen. *Therionology* **84**(9): 1447-1454.
- Sharma R, Agarwal A. 2011. Spermatogenesis: an overview. Pages 19-44 in Zini A, Agarwal A, editors. *Sperm Chromatin*. Springer, New York.
- Shi LZ, Nascimento J, Berns MW, Botvinick EL. 2006. Computer-based tracking of single sperm. *Journal of biomedical optics* **11**(5): 054009.
- Shulman A, Hauser R, Lipitz S, Frenkel Y, Dor J, Bilder D, Mashiach S, Yavetz H. 1998. Sperm motility is a major determinant of pregnancy outcome following intrauterine insemination. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **15**: 381-385.
- Shung KP. 2018. Accuracy, Precision, Recall or F1? Towards Data Science. Available from: <https://towardsdatascience.com/@koolanalytics> (accessed April 2020).
- Šíma J, Neruda R. 1996. Teoretické otázky neuronových sítí. MatfyzPress, Praha.
- Sloter E, Schmid TE, Marchetti F, Eskenazi B, Nath J, Wyrobek AJ. 2006. Quantitative effects of male age on sperm motion. *Human Reproduction* **21**(11): 2868-2875.
- Soler C, Picazo-Bueno J, Micó V, Valverde A, Bompard D, Blasco FJ, García-Molina A. 2018. Effect of counting chamber depth on the accuracy of lensless microscopy for the assessment of boar sperm motility. *Reproduction, Fertility and Development* **30**(6): 924-934.
- Šimoník O, Šichtař J, Beran J, Maňásková-Postlerová P, Tůmová L, Doležalová M, Folková P, Stádník L, Rajmon R. 2019. Low Density Lipoprotein – important player in increasing cryoprotective efficiency of soybean lecithin-based bull semen extenders. *Animal Reproduction* **16**(2): 267-276.
- Thirumalaraju P, Bormann CL, Kanakasabapathy M, Doshi F, Souter I, Dimitriadis I, Shafiee H. 2018. Automated sperm morphology testing using artificial intelligence. *Fertility and sterility* **110**(4): e432.

- Valverde A, Areán H, Fernández A, Bompart D, García-Molina A, López-Viana J, Soler C. 2019. Combined effect of type and capture area of counting chamber and diluent on Holstein bull sperm kinematics. *Andrologia* **51**(4).
- Varnier DD, Vaughan SD, Johnston L. 1991. Use of a computerized system for evaluation of equine spermatozoal motility. *American Journal of Veterinary Research* **52**: 224-228.
- Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onelin K. 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* **57**: 149-179.
- Vested A, Ramlau-Hansen CH, Bonde JP, Thulstrup AM, Kristensen SL, Toft G. 2011. A comparison of conventional and computer-assisted semen analysis (CRISMAS software) using samples from 166 young Danish men. *Asian Journal of Andrology* **13**(3): 453.
- Vidal AH, Batista AM, da Silva ECB, Gomes WA, Pelinca MA, Silva SV, Guerra MMP. 2013. Soybean lecithin-based extender as an alternative for goat sperm cryopreservation. *Small ruminant research* **109**(1): 47-51.
- Volná E. 2008. *Neuronové sítě 1*. Ostravská univerzita v Ostravě, Ostrava.
- Wan L, Zeiler M, Zhang S, LeCun Y, Fergus R. 2013. *Regularization of Neural Networks using DropConnect*. Courant Institute of Mathematical Science, New York.
- World Health Organisation. 2010. *WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Zinaman MJ, Uhler ML, Vertuno E, Fisher SG, Clegg ED. 1996. Evaluation of computer-assisted semen analysis (CASA) with IDENT stain to determine sperm concentration. *Journal of Andrology* **17**: 288-292.
- Zhang J. 2019. UNet – Line by Line Explanation. *Towards Data Science*. Available from <https://towardsdatascience.com/unet-line-by-line-explanation-9b191c76baf5> (accessed April 2020).

9 Seznam použitých zkratek a symbolů

- AI = *artificial intelligence* (umělá inteligence)
ALH = *amplitude of lateral head displacement* (amplituda laterálního vybočení hlavičky)
ASRM = *American Society for Reproductive Medicine*
ATP = adenosintrifosfát
BCF = *beat-cross frequency* (frekvence křížení)
CASA = *computer assisted sperm analysis* (počítačem řízená analýza spermií)
CNN = *convolutional neural network* (konvoluční neuronové sítě)
ČZU = Česká zemědělská univerzita
DNA = deoxyribonukleová kyselina
DNC = dance
EMG = elektromyografické vyšetření
ESHRE = *European Society of Human Reproduction and Embryology*
FN = *false negative*
FP = *false positive*
FR = *frame rate* (snímací frekvence)
GPU = *graphics processing unit* (grafický procesor)
GT = *ground truth*
Hz = hertz, jednotka frekvence
IT = informační technologie
KVD = katedra veterinárních disciplín
LED = *Light-Emitting Diode*
LIN = *linearity* (linearita)
NIS = *Nikon Imaging Software*
ND2 = *NIS-Elements Image Sequence*
NTSC = *national television standards committee*
PAL = *phase alternative line*
PBS = *phosphate buffered saline* (pufrovaný fyziologický roztok)
PMOT = *progressive motility* (progresivní motilita)
ReLU = *Rectified Linear Unit*, typ aktivační funkce neuronových sítí
S.E.M. = *standard error of mean* (střední chyba průměru)
Sp-TALP = *Sperm-Tyrode's Albumin Lactate Pyruvate*
STR = *straightness* (přímost)
TMOT = *total motility* (celková motilita)
TP = *true positive*
TRIS = tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
VAP = *velocity average pathway* (střední dráhová rychlost)
VCL = *curvilinear velocity* (křivočará rychlost)
VK = variační koeficient
VSL = *velocity straight line* (přímočará rychlost)
 w = váhové vektory
WHO = *World health organization* (Světová zdravotnická organizace)
WOB = *wobble* (Wobblův koeficient)

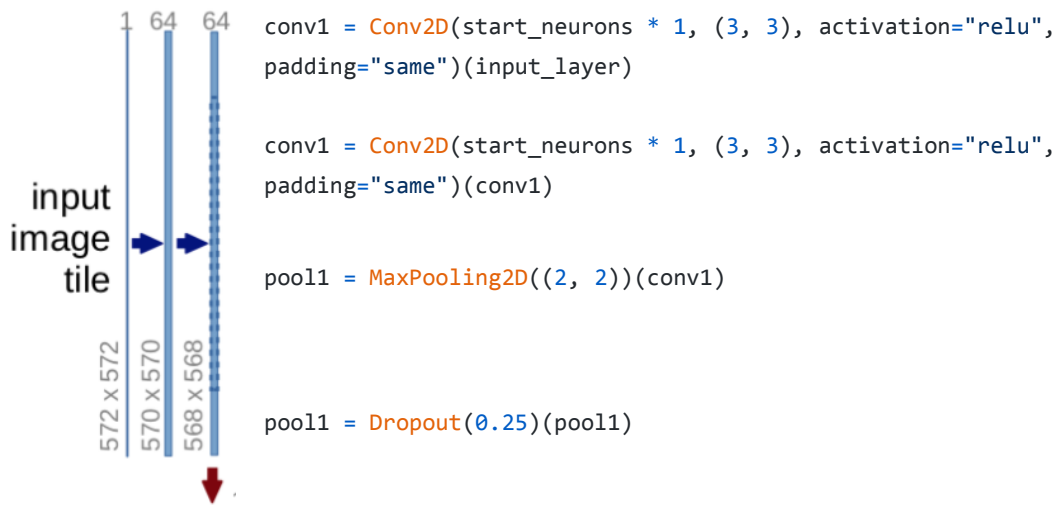
10 Samostatné přílohy

Příloha 1: Popis struktury plně konvoluční sítě U-Net (Zhang 2019).

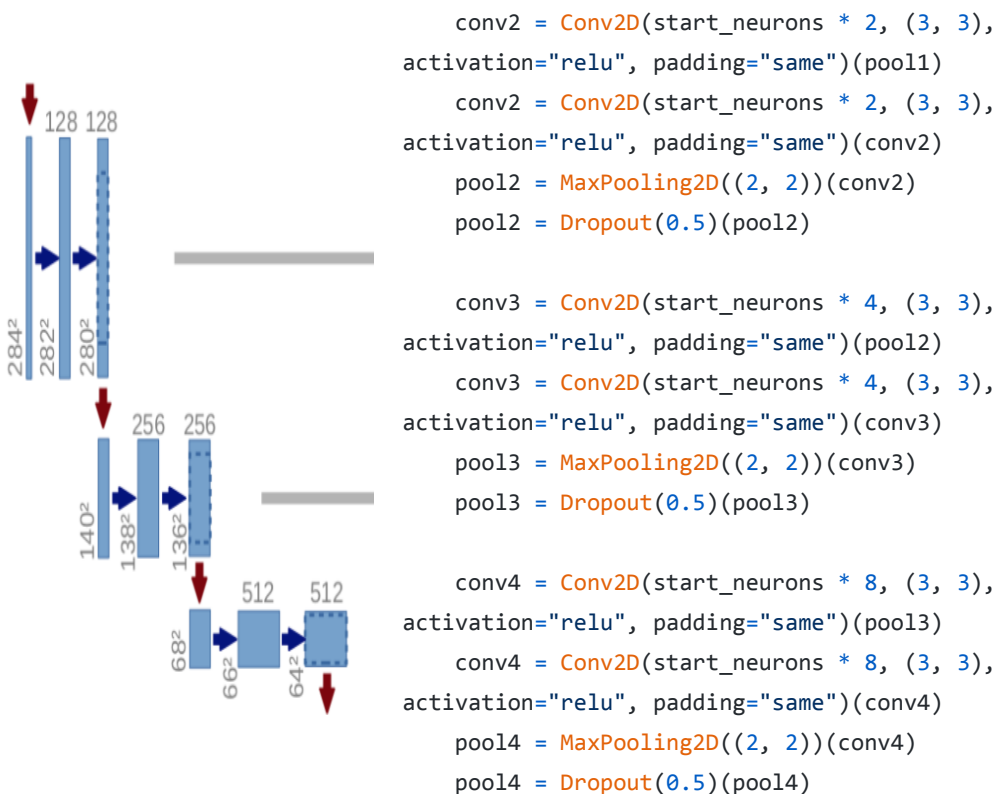
Struktura enkodéru:

conv_layer1 -> conv_layer2 -> max_pooling -> dropout (optional)

Vstupní vrstva následovaná dvěma 3x3 konvolučními vrstvami, které zvyšují množství kanálů z 1 → 64 a vrstvou max-poolingovou, která redukuje velikost obrazu.



Předchozí proces „down sampling“ se třikrát opakuje.



Nejspodnější oddíl spojující kontraktilní a expanzivní část obsahuje pouze dvě konvoluční vrstvy. Max-poolingové vrstvy se v této části nevyskytují.



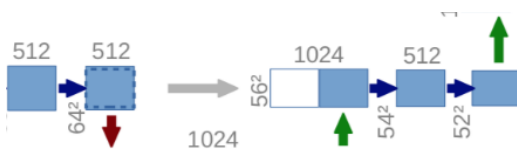
```
# Middle
convm = Conv2D(start_neurons * 16, (3, 3),
activation="relu", padding="same")(pool4)
convm = Conv2D(start_neurons * 16, (3, 3),
activation="relu", padding="same")(convm)
```

Struktura dekodéru:

V druhé části, dekodéru, je obraz převeden zpět na originální velikost podle následujícího postupu.

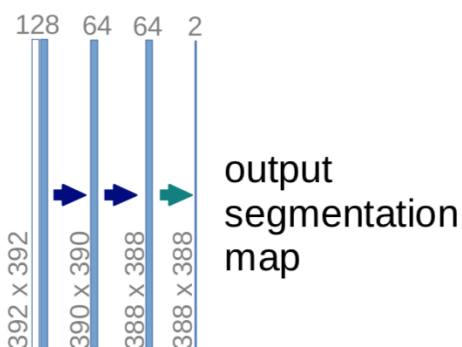
```
conv_2d_transpose -> concatenate -> conv_layer1 -> conv_layer2
```

Při procesu dekonvoluce je pomocí „*up-sampling*“ postupně obnovováno původní rozlišení obrazu. Tento proces se opět třikrát opakuje.



```
deconv4 = Conv2DTranspose(start_neurons * 8,
(3, 3), strides=(2, 2), padding="same")(convm)
uconv4 = concatenate([deconv4, conv4])
uconv4 = Dropout(0.5)(uconv4)
uconv4 = Conv2D(start_neurons * 8, (3, 3),
activation="relu", padding="same")(uconv4)
uconv4 = Conv2D(start_neurons * 8, (3, 3),
activation="relu", padding="same")(uconv4)
```

Poslední vrstva před výstupem segmentace je tvořena jednofiltrovou 1x1 konvoluční vrstvou.



```
output_layer = Conv2D(1, (1,1),
padding="same", activation="sigmoid")(uconv1)
```

Příloha 2: Zdrojový kód implementované sítě U-Net (Hönigschmid 2018).

```
def build_model(input_layer, start_neurons):
    conv1 = Conv2D(start_neurons * 1, (3, 3), activation="relu",
padding="same")(input_layer)
    conv1 = Conv2D(start_neurons * 1, (3, 3), activation="relu", padding="same")(conv1)
    pool1 = MaxPooling2D((2, 2))(conv1)
    pool1 = Dropout(0.25)(pool1)

    conv2 = Conv2D(start_neurons * 2, (3, 3), activation="relu", padding="same")(pool1)
    conv2 = Conv2D(start_neurons * 2, (3, 3), activation="relu", padding="same")(conv2)
    pool2 = MaxPooling2D((2, 2))(conv2)
    pool2 = Dropout(0.5)(pool2)

    conv3 = Conv2D(start_neurons * 4, (3, 3), activation="relu", padding="same")(pool2)
    conv3 = Conv2D(start_neurons * 4, (3, 3), activation="relu", padding="same")(conv3)
    pool3 = MaxPooling2D((2, 2))(conv3)
    pool3 = Dropout(0.5)(pool3)

    conv4 = Conv2D(start_neurons * 8, (3, 3), activation="relu", padding="same")(pool3)
    conv4 = Conv2D(start_neurons * 8, (3, 3), activation="relu", padding="same")(conv4)
    pool4 = MaxPooling2D((2, 2))(conv4)
    pool4 = Dropout(0.5)(pool4)

    # Middle
    convm = Conv2D(start_neurons * 16, (3, 3), activation="relu", padding="same")(pool4)
    convm = Conv2D(start_neurons * 16, (3, 3), activation="relu", padding="same")(convm)

    deconv4 = Conv2DTranspose(start_neurons * 8, (3, 3), strides=(2, 2),
padding="same")(convm)
    uconv4 = concatenate([deconv4, conv4])
    uconv4 = Dropout(0.5)(uconv4)
    uconv4 = Conv2D(start_neurons * 8, (3, 3), activation="relu", padding="same")(uconv4)
    uconv4 = Conv2D(start_neurons * 8, (3, 3), activation="relu", padding="same")(uconv4)

    deconv3 = Conv2DTranspose(start_neurons * 4, (3, 3), strides=(2, 2),
padding="same")(uconv4)
    uconv3 = concatenate([deconv3, conv3])
    uconv3 = Dropout(0.5)(uconv3)
    uconv3 = Conv2D(start_neurons * 4, (3, 3), activation="relu", padding="same")(uconv3)
    uconv3 = Conv2D(start_neurons * 4, (3, 3), activation="relu", padding="same")(uconv3)

    deconv2 = Conv2DTranspose(start_neurons * 2, (3, 3), strides=(2, 2),
padding="same")(uconv3)
    uconv2 = concatenate([deconv2, conv2])
    uconv2 = Dropout(0.5)(uconv2)
```

```

uconv2 = Conv2D(start_neurons * 2, (3, 3), activation="relu", padding="same")(uconv2)
uconv2 = Conv2D(start_neurons * 2, (3, 3), activation="relu", padding="same")(uconv2)

deconv1 = Conv2DTranspose(start_neurons * 1, (3, 3), strides=(2, 2),
padding="same")(uconv2)
uconv1 = concatenate([deconv1, conv1])
uconv1 = Dropout(0.5)(uconv1)
uconv1 = Conv2D(start_neurons * 1, (3, 3), activation="relu", padding="same")(uconv1)
uconv1 = Conv2D(start_neurons * 1, (3, 3), activation="relu", padding="same")(uconv1)

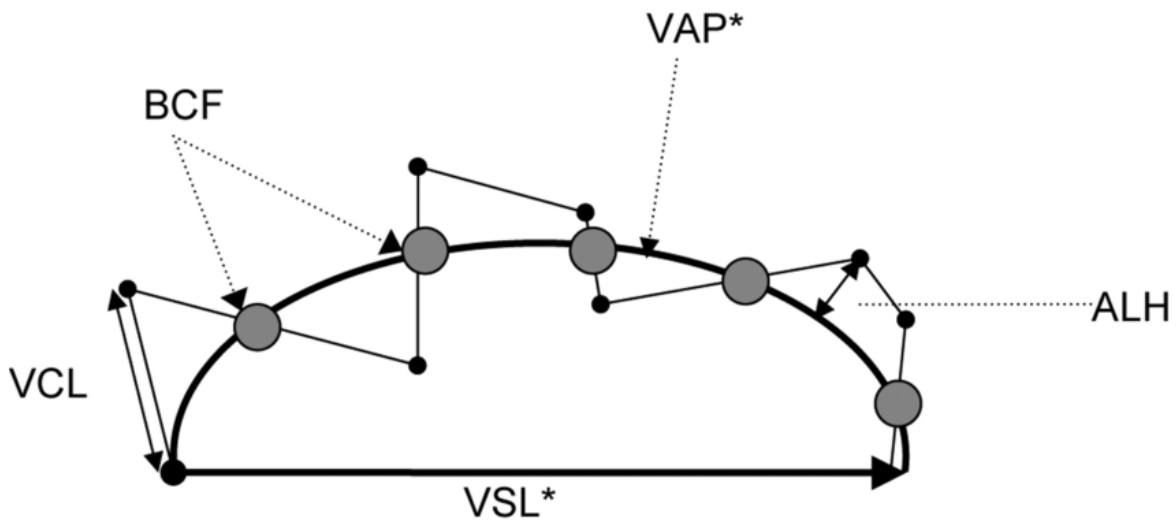
output_layer = Conv2D(1, (1,1), padding="same", activation="sigmoid")(uconv1)

return output_layer

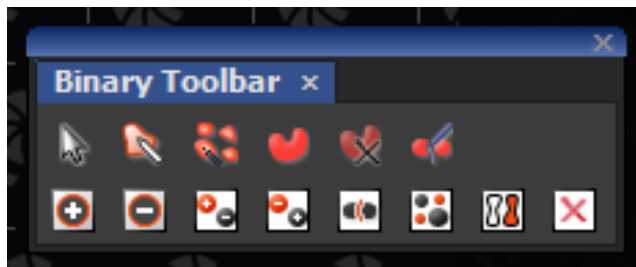
input_layer = Input((img_size_target, img_size_target, 1))
output_layer = build_model(input_layer, 16)

```

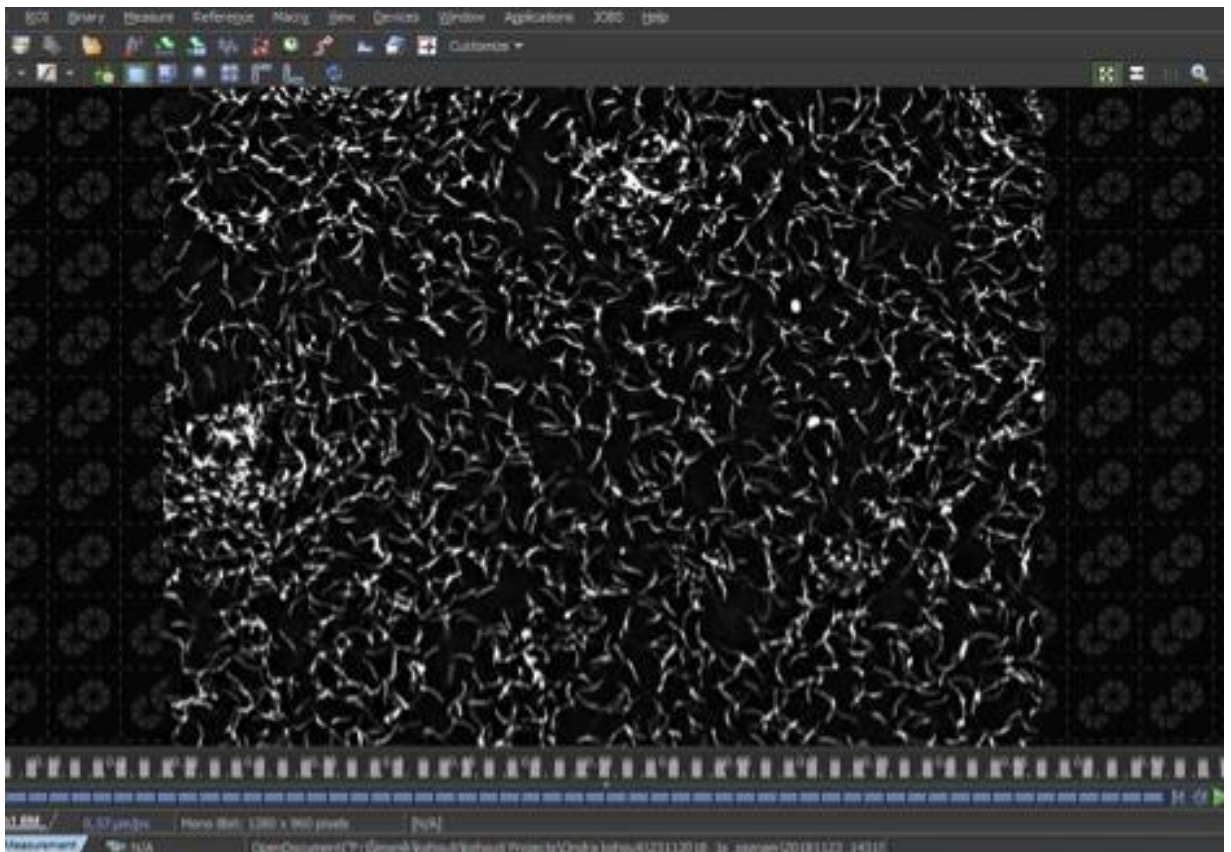
Příloha 3: Schématické znázornění různých parametrů hodnocených CASA – ALH – amplituda laterálního vybočení hlavičky, BCF – frekvence křížení, VCL – křivočará rychlost, VSL – přímočará rychlost, VAP – průměrná rychlost na dráze VCL – křivočará rychlost (Sloter et al. 2006).



Příloha 4: Ikona nástroje Binary Toolbar – první řada zleva: 1. kurzor, 2. automatická detekce objektu, 3. automatická detekce všech objektů, 4. kreslení, 5. vymazání objektu, 6. manuální rozdělení objektů (NIS Elements 4.50, Laboratory Imaging 2020).



Příloha 5: Snímek obrazovky vzorku kohoutích spermií v NIS-Elements, kde je vidět vysoká koncentrace vzorku, vysoká míra křížení a překrývání spermií a jejich odlišná morfologie (NIS-Elements 4.50, Laboratory Imaging 2020).



Příloha 6: Porovnání úspěšnosti segmentace býčích spermií (Sp-TALP) pomocí konvenční metody prahování (*threshold*) a umělé inteligence (Segment Ai).

GT	Thresholded						Segment.ai 02: (1000 epochs, Flip, Borders)					
	TP	FP	FN	Precision	Recall	F1	TP	FP	FN	Precision	Recall	F1
166	153	3	13	0,981	0,922	0,950	158	5	8	0,969	0,952	0,960
166	146	4	20	0,973	0,880	0,924	155	7	11	0,957	0,934	0,945
225	189	5	36	0,974	0,840	0,902	208	9	17	0,959	0,924	0,941
224	181	8	43	0,958	0,808	0,877	203	11	21	0,949	0,906	0,927
256	196	6	60	0,970	0,766	0,856	237	13	19	0,948	0,926	0,937
259	195	6	64	0,970	0,753	0,848	245	8	14	0,968	0,946	0,957
140	128	5	12	0,962	0,914	0,938	134	5	6	0,964	0,957	0,961
141	130	4	11	0,970	0,922	0,945	134	5	7	0,964	0,950	0,957
102	90	14	12	0,865	0,882	0,874	96	3	6	0,970	0,941	0,955
104	91	14	13	0,867	0,875	0,871	101	3	3	0,971	0,971	0,971
147	134	4	13	0,971	0,912	0,940	142	1	5	0,993	0,966	0,979
149	130	5	19	0,963	0,872	0,915	139	6	10	0,959	0,933	0,946
108	103	6	5	0,945	0,954	0,949	105	2	3	0,981	0,972	0,977
109	103	9	6	0,920	0,945	0,932	104	2	5	0,981	0,954	0,967
104	92	5	12	0,948	0,885	0,915	97	6	7	0,942	0,933	0,937
104	91	5	13	0,948	0,875	0,910	93	7	11	0,930	0,894	0,912
107	99	8	8	0,925	0,925	0,925	101	3	6	0,971	0,944	0,957
107	92	11	15	0,893	0,860	0,876	99	3	8	0,971	0,925	0,947
108	101	3	7	0,971	0,935	0,953	99	4	9	0,961	0,917	0,938
105	92	5	13	0,948	0,876	0,911	94	5	11	0,949	0,895	0,922
127	118	5	9	0,959	0,929	0,944	122	3	5	0,976	0,961	0,968
128	115	6	13	0,950	0,898	0,924	118	4	10	0,967	0,922	0,944
205	170	9	35	0,950	0,829	0,885	192	10	13	0,950	0,937	0,943

206	172	10	34	0,945	0,835	0,887	197	8	9	0,961	0,956	0,959
95	86	7	9	0,925	0,905	0,915	87	5	8	0,946	0,916	0,930
94	86	7	8	0,925	0,915	0,920	86	4	8	0,956	0,915	0,935
195	159	11	36	0,935	0,815	0,871	173	10	22	0,945	0,887	0,915
195	161	8	34	0,953	0,826	0,885	175	10	20	0,946	0,897	0,921
94	81	6	13	0,931	0,862	0,895	81	9	13	0,900	0,862	0,880
90	79	7	11	0,919	0,878	0,898	79	9	11	0,898	0,878	0,888
150	138	7	12	0,952	0,920	0,936	143	4	7	0,973	0,953	0,963
149	139	4	10	0,972	0,933	0,952	143	4	6	0,973	0,960	0,966
307	141	9	166	0,940	0,459	0,617	276	19	31	0,936	0,899	0,917
305	144	5	161	0,966	0,472	0,634	280	13	25	0,956	0,918	0,936
167	162	2	5	0,988	0,970	0,979	161	2	6	0,988	0,964	0,976
169	162	2	7	0,988	0,959	0,973	161	3	8	0,982	0,953	0,967
105	96	4	9	0,960	0,914	0,937	97	3	8	0,970	0,924	0,946
104	97	4	7	0,960	0,933	0,946	99	1	5	0,990	0,952	0,971
137	129	4	8	0,970	0,942	0,956	131	2	6	0,985	0,956	0,970
138	128	5	10	0,962	0,928	0,945	129	5	9	0,963	0,935	0,949
87	51	32	36	0,614	0,586	0,600	80	4	7	0,952	0,920	0,936
87	64	21	23	0,753	0,736	0,744	82	1	5	0,988	0,943	0,965
115	103	5	12	0,954	0,896	0,924	108	3	7	0,973	0,939	0,956
115	109	3	6	0,973	0,948	0,960	110	3	5	0,973	0,957	0,965
120	112	4	8	0,966	0,933	0,949	114	5	6	0,958	0,950	0,954
118	111	4	7	0,965	0,941	0,953	112	5	6	0,957	0,949	0,953
104	93	8	11	0,921	0,894	0,907	100	2	4	0,980	0,962	0,971
103	93	8	10	0,921	0,903	0,912	99	3	4	0,971	0,961	0,966
109	90	11	19	0,891	0,826	0,857	100	4	9	0,962	0,917	0,939
107	93	11	14	0,894	0,869	0,882	103	2	4	0,981	0,963	0,972
138	134	1	4	0,993	0,971	0,982	136	2	2	0,986	0,986	0,986
137	125	5	12	0,962	0,912	0,936	124	8	13	0,939	0,905	0,922

195	134	27	61	0,832	0,687	0,753	146	39	49	0,789	0,749	0,768
196	139	28	57	0,832	0,709	0,766	156	36	40	0,813	0,796	0,804
403	36	25	367	0,590	0,089	0,155	349	33	54	0,914	0,866	0,889
401	34	25	367	0,576	0,085	0,148	340	35	61	0,907	0,848	0,876
291	111	54	180	0,673	0,381	0,487	255	16	36	0,941	0,876	0,907
284	116	64	168	0,644	0,408	0,500	264	12	20	0,957	0,930	0,943
119	115	2	4	0,983	0,966	0,975	113	6	6	0,950	0,950	0,950
126	112	6	14	0,949	0,889	0,918	111	8	15	0,933	0,881	0,906
72	52	15	20	0,776	0,722	0,748	66	7	6	0,904	0,917	0,910
71	51	17	20	0,750	0,718	0,734	66	6	5	0,917	0,930	0,923
173	155	11	18	0,934	0,896	0,914	163	23	10	0,876	0,942	0,908
165	156	13	9	0,923	0,945	0,934	157	22	8	0,877	0,952	0,913
235	158	10	77	0,940	0,672	0,784	214	6	21	0,973	0,911	0,941
231	158	11	73	0,935	0,684	0,790	216	8	15	0,964	0,935	0,949
78	51	28	27	0,646	0,654	0,650	70	1	8	0,986	0,897	0,940
80	52	28	28	0,650	0,650	0,650	74	0	6	1,000	0,925	0,961
93	81	6	12	0,931	0,871	0,900	85	7	8	0,924	0,914	0,919
94	75	11	19	0,872	0,798	0,833	85	5	9	0,944	0,904	0,924
153	137	5	16	0,965	0,895	0,929	141	6	12	0,959	0,922	0,940
154	142	4	12	0,973	0,922	0,947	144	4	10	0,973	0,935	0,954
121	114	2	7	0,983	0,942	0,962	117	3	4	0,975	0,967	0,971
123	113	3	10	0,974	0,919	0,946	119	1	4	0,992	0,967	0,979
78	73	11	5	0,869	0,936	0,901	74	8	4	0,902	0,949	0,925
78	76	12	2	0,864	0,974	0,916	78	5	0	0,940	1,000	0,969
146	129	3	17	0,977	0,884	0,928	134	6	12	0,957	0,918	0,937
150	140	0	10	1,000	0,933	0,966	142	3	8	0,979	0,947	0,963
155	147	4	8	0,974	0,948	0,961	147	6	8	0,961	0,948	0,955
153	146	3	7	0,980	0,954	0,967	147	3	6	0,980	0,961	0,970
137	124	6	13	0,954	0,905	0,929	126	5	11	0,962	0,920	0,940

135	122	6	13	0,953	0,904	0,928	123	5	12	0,961	0,911	0,935
163	153	3	10	0,981	0,939	0,959	157	5	6	0,969	0,963	0,966
159	143	3	16	0,979	0,899	0,938	145	9	14	0,942	0,912	0,927
178	156	9	22	0,945	0,876	0,910	165	10	13	0,943	0,927	0,935
173	149	7	24	0,955	0,861	0,906	164	10	9	0,943	0,948	0,945
115	99	13	16	0,884	0,861	0,872	104	4	11	0,963	0,904	0,933
115	106	9	9	0,922	0,922	0,922	109	3	6	0,973	0,948	0,960
124	109	6	15	0,948	0,879	0,912	116	3	8	0,975	0,935	0,955
123	107	7	16	0,939	0,870	0,903	112	5	11	0,957	0,911	0,933
93	82	11	11	0,882	0,882	0,882	88	4	5	0,957	0,946	0,951
94	80	13	14	0,860	0,851	0,856	88	4	6	0,957	0,936	0,946
135	123	9	12	0,932	0,911	0,921	124	9	11	0,932	0,919	0,925
131	121	9	10	0,931	0,924	0,927	121	7	10	0,945	0,924	0,934
161	139	10	22	0,933	0,863	0,897	142	13	19	0,916	0,882	0,899
162	142	11	20	0,928	0,877	0,902	146	12	16	0,924	0,901	0,912
148	137	4	11	0,972	0,926	0,948	141	2	7	0,986	0,953	0,969
150	145	1	5	0,993	0,967	0,980	149	1	1	0,993	0,993	0,993
110	106	3	4	0,972	0,964	0,968	110	1	0	0,991	1,000	0,995
110	107	5	3	0,955	0,973	0,964	110	1	0	0,991	1,000	0,995
14765	11730	938	3035	0,926	0,794	0,855	13655	706	1110	0,951	0,925	0,938

Příloha 7: Výsledky kinematických parametrů (průměrná hodnota na *jobrun*)
analyzované pomocí SpermMotility tasku (konvenční metoda).

MOT	PMOT	STR	WOB	ALH	VSL	VAP	VCL	LIN	BCF
57,303	54,182	92,419	58,488	7,339	122,560	130,206	222,774	54,501	15,959
58,060	55,046	92,068	53,091	7,009	112,358	120,828	230,808	49,007	14,490
52,138	49,793	93,224	57,431	7,413	123,933	130,743	228,465	53,829	14,818
44,815	43,148	94,598	59,670	7,708	118,871	123,607	212,041	56,613	14,004
60,740	57,610	93,768	60,327	6,698	116,016	121,902	202,875	57,033	16,676
52,284	50,361	94,269	63,358	7,129	125,132	130,745	205,005	60,197	17,515
65,439	62,470	94,128	62,254	7,731	131,627	137,948	221,677	59,060	16,237
50,120	48,313	94,809	62,682	7,749	136,908	141,989	226,036	59,885	17,335
48,680	44,884	91,858	60,850	7,067	117,864	125,063	210,215	56,021	16,440
74,161	67,309	90,682	61,836	6,083	98,703	105,260	168,175	57,204	16,781
54,343	50,668	90,728	62,295	6,177	99,952	106,852	168,810	57,418	15,729
62,378	56,965	91,217	64,425	5,961	100,813	106,342	161,505	59,857	17,528
67,700	65,633	94,882	66,578	6,911	122,010	127,047	192,159	63,508	17,807
50,441	49,265	93,539	53,126	4,473	71,646	75,885	145,476	49,821	13,091
54,880	48,656	86,675	45,482	4,271	52,692	60,469	140,147	40,107	12,592
45,896	42,537	90,492	53,438	5,913	92,620	98,622	184,197	49,201	14,018
59,211	56,203	92,729	59,658	7,957	129,331	136,682	228,852	55,876	15,222
73,669	64,676	87,292	53,442	7,617	108,268	120,377	224,280	47,416	13,911
41,775	36,790	88,591	57,249	5,465	85,848	91,468	153,760	52,415	14,937
70,489	62,057	88,009	53,878	6,336	93,817	102,271	188,987	48,555	14,320
58,393	53,917	88,277	48,765	6,603	88,947	98,981	212,296	43,611	12,501
64,326	54,494	81,838	39,836	7,130	74,162	89,404	233,087	32,810	10,004
56,112	53,551	94,057	61,602	7,604	108,543	113,135	183,894	58,374	13,950
65,573	57,585	84,941	48,997	6,872	82,812	95,848	201,315	42,157	12,464
76,808	71,869	93,237	70,217	7,201	123,835	129,199	180,692	66,369	18,862

Příloha 8: Výsledky kinematických parametrů (průměrná hodnota na *jobrun*) pomocí AI trackingu (využití natrénovaných neuronových sítí).

MOT	PMOT	STR	WOB	ALH	VSL	VAP	VCL	LIN	BCF
61,558	55,974	87,046	60,231	5,068	120,709	134,224	221,489	53,134	9,410
59,698	54,660	85,812	55,917	5,389	109,152	125,007	226,653	48,234	10,169
53,567	49,125	87,571	59,239	5,138	120,878	133,555	225,134	52,561	10,061
47,601	45,018	90,288	61,528	5,401	115,537	125,133	207,754	55,978	8,410
60,490	55,041	88,512	62,372	4,544	113,705	124,788	200,073	56,012	9,911
53,964	49,112	89,436	64,715	4,609	121,422	131,024	199,945	58,801	9,854
65,345	60,476	89,795	64,216	5,166	129,177	140,546	218,655	58,257	10,17
53,309	50,000	90,412	64,341	5,149	135,19	145,223	224,686	58,935	9,856
49,753	43,328	87,347	62,967	4,878	116,566	128,962	209,499	55,280	9,965
77,376	66,312	86,249	63,475	4,205	96,144	105,751	164,246	56,132	8,953
55,678	49,504	86,788	63,963	3,983	97,526	107,078	164,931	56,656	9,350
63,850	56,359	87,492	65,927	3,888	98,987	107,077	159,025	59,054	9,396
70,759	66,076	90,885	66,981	4,333	116,912	124,718	185,670	61,651	8,965
50,354	46,959	88,149	55,330	3,488	71,003	79,421	146,682	48,836	9,720
54,743	41,734	77,047	50,626	3,586	51,815	67,685	139,903	39,753	11,486
49,005	41,667	82,968	56,772	4,416	88,004	99,983	176,696	48,076	10,971
61,567	55,300	87,184	61,483	5,508	125,949	139,04	224,372	54,506	10,377
78,667	64,370	80,935	57,013	5,926	108,102	128,011	223,517	47,030	10,419
45,481	35,462	81,347	59,566	3,900	80,840	90,667	146,442	50,523	11,498
76,420	62,565	81,089	56,685	4,764	91,101	105,754	185,438	47,292	10,809
61,900	51,461	80,158	53,427	5,247	87,168	107,206	208,512	43,615	10,676
65,585	42,454	71,338	45,379	6,145	73,130	101,551	232,578	32,587	10,750
56,779	54,114	90,595	63,847	5,279	108,448	117,227	183,937	58,267	8,412
73,443	56,810	76,506	53,276	5,650	81,883	105,021	201,858	41,411	11,237
79,360	70,598	89,363	70,374	4,372	118,043	125,720	174,660	64,244	9,331