

VYUŽITÍ ANALÝZY OBRAZU PŘI URČOVÁNÍ POLOHY JÁDRA V OVOCYTECH JESETEROVITÝCH RYB

APPLICATION OF IMAGE ANALYSIS FOR THE DETERMINATION OF NUCLEUS POSITION IN STURGEON OOCYTES

(souhrn technické poznámky publikované v J.Appl. Ichthyol. 22 (Supl. 1) (2006), 373-374

Ing. Marek Rodina PhD.

Metodu a techniku určování zralosti ovocytu podle polohy jádra u jesetrovitých druhů navrhl Truskov (1964) a vylepšil Kazanskii a kol (1978). Postupy používané v praxi se liší pouze technickým provedením a použitou pozorovací technikou. V této technické poznámce bude popsána aplikace počítačové analýzy pro vyhodnocování polohy jádra z digitálních fotografií řezů biopticky odebraných ovocytů fixovaných v Sérově roztoku, kterou používáme na pracovišti VURH JU k měření polohy jádra ovocytů u jesetera sibiřského, jesetera malého, jesetera hvězdáného, jesetera ruského.

Biopticky odebrané ovocyty se fixují po dobu minimálně 24 hodin v Sérově roztoku (nejlépe čerstvě připraveném). Fixované ovocyty se před dalším zpracováním propláchnou vodou a jednotlivé ovocyty se rozříznou žiletkou v rovině podélné osy.

Vizualizace: Úspěšné a přesné stanovení zralosti ovocytu jeseterovitých metodou určování polohy jádra je závislé na co nejlepší vizualizaci jádra, která je dána způsobem fixace (fixace varem (Kazanskii a kol 1978) nebo v Sérově roztoku,), kvalitou řezu a osvětlením řezu při mikroskopování.

Připravené řezy se pozorují pod stereomikroskopem (Zeiss STEMI 2000-C), ke kterému je adaptérem Olympus MI2000 připojen digitální fotoaparát Olympus Camedia C2000 ZOOM napojený na videomonitor. Pro dobrou vizualizaci se řezy jiker pozorují pod hladinou vody (v petriho misce) s oboustranným bočním nasvícením (pomocí světelného zdroje Zeiss KL1500 Electronic se dvěma flexibilními světlovody). Optimální nastavení bočního osvětlení nastavíme podle obrazu snímaného digitálním fotoaparátem a zobrazeného na videomonitoru. Zaostrěný preparát s dobře znatelným jádrem se vyfotografuje digitálním fotoaparátem a fotografie se nakopírují na HDD počítače.

Měření: Pro měření polohy jádra ovocytu z digitálního snímku používáme software na analýzu 2D obrazu MicroImage 4.0 od firmy Olympus. V režimu manuálního měření pomocí nástroje LENTGH se označí a změří nejprve podélná délka ovocytu a potom vzdálenost okraje jádra od vnitřního okraje ovocytu (obr.1). Výsledné 2 hodnoty se exportují přes schránku Windows do sešitu MS Excel, kde se vypočítá index polarizace jádra (vzdálenost jádra od okraje ovocytu, $L2 \cdot 100 / \text{průměr ovocytu}$, $L1$).

Pro urychlení práce je celý postup měření, ukládání a exportu dat zapsán v podobě maker (jazykem Visual Basic), jimž jsou v nástrojovém liště přiřazena uživatelské tlačítka, takže lze celé měření ovládat pouze 4 tlačítka (ikonami), např: tlačítko 1 vyvolá dotaz na výběr skupiny snímků, po jejichž zadání je aktivován režim manuálního měření a finálně je zvolen nástroj měření délky. Tlačítkem 2 zvětšíme obraz, aktivujeme možnost úpravy kontrastu, jasu atd. Pomocí myši označíme hraniční body měřených vzdáleností a stiskem tlačítka 3 naměřená data vyexportujeme, změřený snímek uzavřeme, zvolíme další snímek z vybrané skupiny. Po přepnutí do Excelu aktivujeme stiskem tlačítka 4 makro, které vloží naměřená data do tabulky a vypočte index polarizace jádra.

Experimentální porovnání metod Pro objektivní porovnání metod (prezentované používající analýzu obrazu s klasickou metodou používající měření okulárovým mikrometrem a výpočet polarizace pomocí PC nebo kalkulačky) bylo použito 60 řezů ovocytů. Každý byl měřen 3x a to oběma metodami. Ze 3 měření byl vypočten průměr a variační koeficient; dále celkový průměr za metodu a průměrná hodnota variačního koeficientu. Průměrné hodnoty byly porovnány párovým T-testem. Během zpracování byl sledován čas potřebný pro změření 60 jiker (1x), přičemž čas zahrnoval dobu měření a dobu pro výpočet ukazatele polohy jádra, nezahrnoval čas na přípravu řezů. (viz Tabulka 1)

Výhody: Použití digitálního snímání, přenosu a zpracování obrazu má oproti klasickému způsobu, tj. měření pomocí okulárového měřítka stereomikroskopu, popř. pouze odhad vzdálenost, řadu výhod. Je to možnost úpravy digitálního obrazu před měřením, tzn. digitální zaostření, úprava kontrastu a jasu obrazu, dále vyšší přesnost, možnost archivace snímků a opakovaného měření dalších parametrů či zaslání snímků k vyhodnocení po internetu.

Popsaný postup využívající běžně dostupné digitální techniky urychluje zpracování většího počtu vzorků ovocytů, zvyšuje přesnost stanovení polohy jádra a tím i přesnost stanovení připravenosti jikernaček k výtěru.

Modifikace: Uvedený postup má samozřejmě mnoho různých modifikací, např. použití mikroskopické CCD kamery místo fotoaparátu a snímání obrázků pomocí framegrabberu počítače, nebo jen použití přenosného TV přijímače jako videomonitoru a měření přímo na obrazovce nebo ze záznamu na videokazetě.

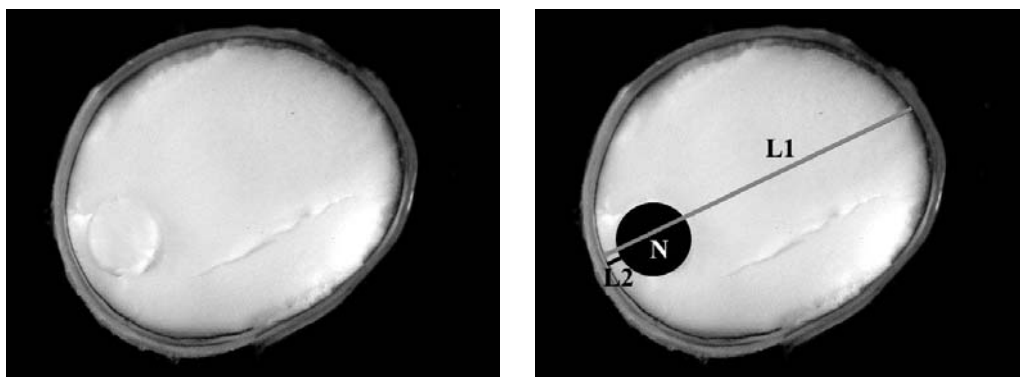
Literatura:

Dettlaff, T. A.; Ginsburg, A. S.; Schmalhausen, O. I., 1993: Sturgeon fishes developmental biology and aquaculture. Berlin: Springer-Verlag.

Kazanskii BN, Feklov YuA, Podushka SB, Molodsov AN (1978) Express metod for determining the degree of gonad maturity in sturgeon spawners. Rybnoe Khozajstvo (2): 24-27

Trusov VZ (1964) Metod of estimation of the degree of the gonad maturity in sturgeon females . Rybnoe Khozajstvo (1): 26-28

Obr . 1: Řez fixovaným oocytem jesetera sibiřského (*Acipenser baerii*), vpravo se zvýrazněným jádrem a s vyznačením měřených vzdáleností L1 - průměr ovocytu a L2 - vzdálenost jádra od okraje ovocytu



Tabulka 1: Pokusné porovnání zpracování vzorků prezentovanou technikou a klasickou technikou (měření řezů okulárovým mikrometrem a výpočet polarizace pomocí PC nebo kalkulačky)

	Analýzou	Klasicky
celková průměrná hodnota polarizace	18,46	18,89
průměrný variační koeficient	1,92	4,04
průměrná diference	-0,43	
průkaznost rozdílu párovým t testem	neprůkazný	
čas potřebný pro zpracování	62 min	90 min