

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА
Інститут високих технологій**

Завідувач кафедри нанофізики
конденсованих середовищ
проф. Валерій Антонович Скришевський
Протокол № _____ засідання кафедри
від “ _____ ” _____ 2021 р.

**АВТОМАТИЧНА ХАРАКТЕРИЗАЦІЯ СПЕРМАТОЗОЇДІВ ЛЮДИНИ
ЗАМОРФОЛОГІЄЮ ТА ХРОМОСОМНИМИ АБЕРАЦІЯМИ З
ВИКОРИСТАННЯМ МЕТОДУ РАМАНІВСЬКОЇ СПЕКТРОСКОПІЇ**

Випускна кваліфікаційна робота бакалавра
студентки 4 курсу
зі спеціальністю 104 «Фізика»

Марії Куріленко

Наукові керівники:

молодший науковий співробітник НДЛ
«Електронно-оптичних процесів» фізичного
факультету, кандидат фіз.-мат. наук

Олександр Становий,

асистент кафедри експериментальної фізики
фізичного факультету, кандидат фіз.-мат. наук

Наталія Башмакова

Оцінка захисту роботи

Київ 2021 р.

РЕФЕРАТ

Випускна кваліфікаційна робота бакалавра вміщує 39 стор., 24 рис., 22 джерел.

Ключові слова: *СПЕРМАТОЗОЇД, РАМАНІВСЬКА СПЕКТРОСКОПІЯ, АКРОСОМА, ХРОМОСОМИ*

У роботі описано метод відбору сперматозоїдів людини за наявністю важливих функціональних частин (акросома, ядро, мітохондрія) визначених спектрально, методом спектроскопії комбінаційного розсіяння (раманівська спектроскопія). Описані основні методи автоматичної обробки даних та методи перевірки отриманих результатів. Надано розшифровку наявних спектральних ліній для відсканованих зразків та визначено просторові відмінності, що відповідають біохімічному складу вказаних вище частин. Побудовано та пояснено порівняльні зображення для декількох сперматозоїдів та діаграми розділення за хромосомним складом.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	4
1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	6
1.1. Коливальна спектроскопія.....	6
1.2. Комбінаційне розсіяння світла.....	7
1.3. Будова сперматозоїда.....	12
1.4. Морфологічні аномалії.....	13
1.5. Хромосомні аномалії.....	13
1.6. Методи визначення морфології та хромосомного складу сперматозоїдів.....	14
2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ.....	16
2.1. Параметри установки.....	16
2.2. Метод прямого спливання.....	17
2.3. Методи обробки даних.....	17
2.3.1. Калібрування частоти в спектрах.....	17
2.3.2. Метод головних компонент (PCA).....	18
2.3.3. Мультиплікативне нормування сигналу (MSC).....	19
2.3.4. Метод перевірки.....	21
3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА.....	23
3.1. Постановка задачі.....	23
3.2. Приготування зразка.....	23
3.3. Попередня обробка даних.....	24
3.4. Класифікація спектрів.....	26
3.5. Аналіз результатів.....	29
4. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ВИСНОВКИ.....	36
ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ.....	37

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ІЧ — інфрачервоний
КРС – комбінаційне розсіяння світла
АТР – аденозинтрифосфат
ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота
НА – гіалуронова кислота
FISH – флуоресцентна гібридизація *in situ*
РСА – метод головних компонент
NADH – Нікотинамідаденіндинуклеотид

ВСТУП

Раманівська спектроскопія одна з небагатьох неінвазивних методик, що дозволяють досліджувати біологічні зразки в живому стані, не пошкоджуючи їх, тобто досліджувані зразки можна буде в подальшому використовувати. Це надає можливості для використання даної технології у медицині. Тема визначення критеріїв зрілості та правильної морфологічної сформованості сперматозоїдів актуальна як в контексті активного розвитку репродуктивної медицини, так і в сільському господарстві. Спектральне виявлення хромосомних аберацій надає можливості для отримання більш поглиблених лабораторних аналізів та попередження проблем пов'язаних з моносомією та полісомією хромосом (сюди відносять також синдром Дауна) та хворобами, що передаються по чоловічій або жіночій лінії як то синдром Тернера. Визначення критеріїв зрілості за спектрами комбінаційного розсіювання світла окремих сперматозоїдів у подальшому може бути використано для проектування методів автоматичної діагностики. Такий підхід значно пришвидшить процес аналізу, а також допоможе позбавитись помилок спричинених людським фактором.

Також, актуальною є розробка методик автоматизації лабораторних досліджень у зв'язку з ускладненням в роботі, спричиненими пандемією COVID-19.

1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Коливальна спектроскопія

За не нульової абсолютної температури атоми молекул не знаходяться в положенні рівноваги. Відбуваються валентні (вздовж зв'язків) та деформаційні коливання атомів, а також обертальні коливання всієї молекули.

Для невзаємодіючих молекул, що складаються з N атомів існує $3N-6$ коливальних ступенів свободи ($3N-5$ для лінійної молекули), тобто всі вібраційні спотворення можуть бути описані як сукупність $3N-6$ нормальних мод коливань. Двохатомна молекула, як окремий випадок лінійної, має лише одне коливання, при якому змінюється відстань між двома атомами молекули.

У випадку багатоатомних молекул коливання досить складні: крім смуг, що відповідають нормальним коливанням, в спектрі проявляються смуги з частотами, кратними частотам основного коливання (обертони), і частотами, які є сумою і різницею частот основних коливань. А також сукупні коливання різних фрагментів молекули. Часто це трьохатомні фрагменти молекули, наприклад, метиленова група ($-\text{CH}_2-$) в органічних молекулах. У ряді випадків можна виділити такі коливання, при яких змінюються переважно довжини зв'язків, або кути між зв'язками. Перше коливання називається валентним (бувають симетричні та асиметричні), друге - деформаційним. Однак, в кожному коливанні як правило беруть участь сусідні зв'язки та прилеглі кути, тобто не існує чисто валентних або чисто деформаційних коливань (за винятком коливань лінійних і плоских циклічних молекул). [1]

Можна виділити чотири основних типи деформаційних коливань трьохатомного фрагмента молекули, що показані на Рис. 1.

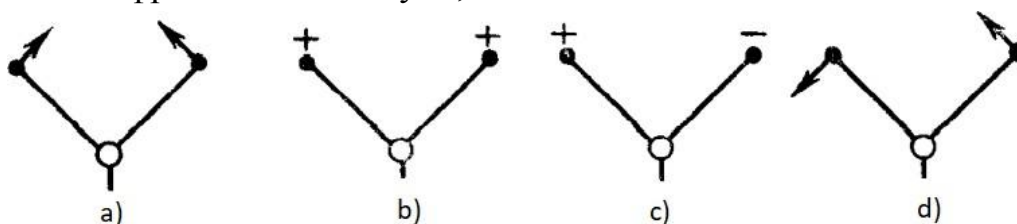


Рис. 1. Деформаційні коливання метильної групи: а) ножницеви (scissoring) б) вієрні (wagging) в) крутильні (twisting) г) маятникові (rocking).

У класичній механіці зв'язки між атомами розглядаються як пружини що коливаються, у квантовій – потенціальна енергія, що залежить від координати та є квантованою.

Електромагнітне випромінювання що проходить через речовину - це чиста енергетична хвиля, тобто вона не має інерційної маси, і тому може взаємодіяти лише через свої електричні та магнітні поля. Для коливальної спектроскопії електричні дипольні взаємодії з електричним полем є домінуючими, тому можна ігнорувати магнітне поле.

Сили і маси ядер всередині молекул такі, що частоти коливань лежать в межах 10¹²–10¹⁴ Гц.

Оскільки довжина хвилі є зручнішою в обчисленні величиною ніж частота, більш розповсюдженим є описання такого випромінювання за його оберненою довжиною хвилі (хвильовим числом). Загальноприйнятою одиницею вимірювань є см⁻¹ (обернені сантиметри). Таким чином, основні вібрації знаходяться нижче 3700 см⁻¹. Зазвичай нижня межа становить 200 см⁻¹, пов'язана з експериментальними складнощами, хоча є експериментальні методики, які передбачають спектроскопічні вимірювання низькочастотних коливань. [2]

Найпростіший спосіб спостереження за переходами між коливальними станами молекул - через поглинання інфрачервоного (ІЧ) випромінювання. Взаємодія речовини з електромагнітним полем підпорядковується правилам відбору, отже, не всі коливальні моди можуть проявлятися як смуги поглинання (або випромінювання) ІЧ спектру. Передумовою активності в ІЧ є зміна дипольного моменту молекули під час нормальних коливань молекули. Результатом ІЧ спектроскопії є функція інтенсивності пропущеного інфрачервоного випромінювання від його частоти. Дипольний момент найбільш помітний у несиметричних молекул.

У випадку симетричних коливань, які не створюють електричний дипольний момент, не відбувається поглинання або випромінювання електромагнітної хвилі, оскільки дипольний момент переходу нульовий. Смуги з частотами таких коливань не містяться в ІЧ спектрі. Для того, щоб виявити такі коливання, необхідно розглянути непружне розсіяння світла - явище, яке зазвичай називають комбінаційне розсіяння (Раманівське розсіяння).

1.2. Комбінаційне розсіяння світла

При опроміненні речовини монохроматичним випромінюванням (що не знаходяться в смузі поглинання речовини) відбувається збудження на нестійкий рівень E_v. При поверненні молекули в основний стан можуть здійснюватися переходи як на нульовий коливальний рівень (релеєвське розсіяння), так і на коливальні підрівні основного стану (Рис.2). Останній вид називається комбінаційним розсіянням світла.

Різниця частот збудженого і розсіяного світла відповідає коливальним частотам даної молекули.

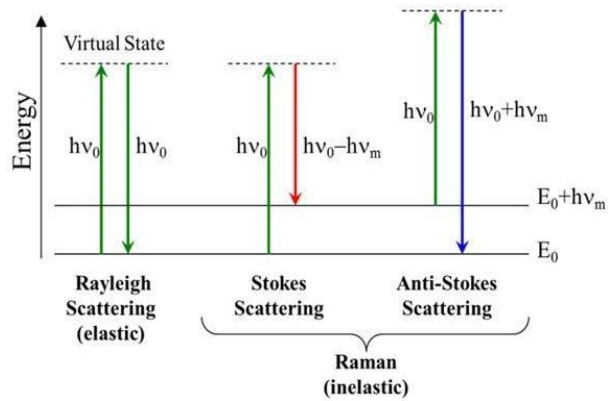


Рис. 2. Різниця переходів між енергетичними рівнями для релєйського розсіяння та раманівського розсіяння.

Класична теорія релєйського та раманівського розсіяння заснована на концепції, що розсіяне світло породжується коливанням електричного диполя, індукованого електричним полем падаючого (збуджуючого) випромінювання. При незначній інтенсивності збуджуючого світла, можна вважати, що індукований дипольний момент p пропорційний до електричної компоненти поля E :

$$p = \alpha(\omega_L, \omega_k) E \quad (1)$$

де α - поляризованість молекули, ω_L - частота падаючого, ω_k - розсіяного світла.

Поляризованість можна розглядати як міру гнучкості електронної хмари: легкість, з якою електронна хмара молекули може бути деформована або зміщена для отримання електричного диполя під впливом зовнішнього електричного поля. [3]

У випадку анізотропності речовини індукований дипольний момент записується як:

$$\begin{pmatrix} p_x \\ p_y \\ p_z \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \alpha_{11} & \alpha_{12} & \alpha_{13} \\ \alpha_{21} & \alpha_{22} & \alpha_{23} \\ \alpha_{31} & \alpha_{32} & \alpha_{33} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} E_x \\ E_y \\ E_z \end{pmatrix} \quad (2)$$

Матриця α має максимум шість незалежних компонент: три діагональні та три недіагональні. Ця матриця обов'язково симетрична в випадку нерезонансного раманівського розсіювання.

Компоненти тензора поляризованості змінюються при обертанні осей x , y , z , але певні їх поєднання залишаються незмінними. Одним з таких інваріантів є так звана середня поляризованість α , яка визначається як:

$$\alpha = \frac{1}{3} (\alpha_{xx} + \alpha_{yy} + \alpha_{zz}) \quad (3)$$

Другий – анізотропія:

$$\gamma = \frac{1}{2} [(\alpha_{xx} - \alpha_{yy})^2 + (\alpha_{yy} - \alpha_{zz})^2 + (\alpha_{zz} - \alpha_{xx})^2 + 3(\alpha_{xy}^2 + \alpha_{yz}^2 + \alpha_{zx}^2)] \quad (4)$$

Потужність розсіяного випромінювання визначається середніми просторовими квадратами компонентів поляризованості, що можуть бути виражені через середню поляризованість α (3) і анізотропію g (4).

Якщо вважати, що молекулярне коливання вносить мале збурення в електронну структуру молекули і в її здатність до поляризації, можна вважати Q_k (координата нормальної моди) малим параметром в розкладанні α_{LL} в степеневий ряд:

$$\alpha_{LL}(Q_k) = \alpha_{LL}(0) + \frac{\partial \alpha_{LL}}{\partial Q_k} Q_k + \frac{1}{2} \frac{\partial^2 \alpha_{LL}}{\partial Q_k^2} Q_k^2 + \dots \quad (5)$$

Подібний вираз може бути записаний для кожної з дев'яти компонент тензора поляризації. За аналогією з останнім вводиться тензор $R_k(\omega_L)$ що складається з компонент $\frac{\partial \alpha_{ij}}{\partial Q_k}$.

Лінійна залежність поляризованості від кожної коливальної координати (для коливань малої амплітуди поблизу рівноваги) може бути представлена як:

$$\alpha_{ij}(Q_k) = \alpha_{ij}(0) + R_{ij}^k(\omega_L) Q_k \quad (6)$$

Нормальні коливання визначають як гармонічні:

$$Q_k = Q_{k0} e^{-i\omega_k t} \quad (7)$$

Електричне поле світлової хвилі змінюється за законом:

$$E = E_0 e^{-i\omega_L t} \quad (8)$$

Тоді вираз для індукованого дипольного моменту може бути представлений таким чином:

$$\begin{aligned} p(t) &= \text{Re}[\alpha_L(\omega_L, Q_k) \mathbf{E}(\omega_L) e^{-i\omega_L t}] = & (9) \\ &= \text{Re}[\alpha_L(\omega_L, 0) \mathbf{E}(\omega_L) e^{-i\omega_L t}] + Q_k(t) \text{Re}[R_k(\omega_L) \mathbf{E}(\omega_L) e^{-i\omega_L t}] = \\ &= \text{Re}[\alpha_L(\omega_L, 0) \mathbf{E}(\omega_L) e^{-i\omega_L t}] + \\ &\underbrace{\frac{Q_k}{2} \text{Re}[R_k(\omega_L) \mathbf{E}(\omega_L) e^{-i(\omega_L - \omega_k)t + i\Phi}]}_{\text{Антистоксова компонента}} + \underbrace{\frac{Q_k}{2} \text{Re}[R_k(\omega_L) \mathbf{E}(\omega_L) e^{-i(\omega_L + \omega_k)t - i\Phi}]}_{\text{Стоксова компонента}} \end{aligned}$$

де Φ - довільна фаза, що виникає в результаті запізнювання розсіяної хвилі в порівнянні з хвилею збудження, ω_L - частота релеївського розсіяння, $\omega_L + \omega_k$ - частота стоксового розсіяння, $\omega_L - \omega_k$ - частота антистоксового розсіяння.

Це показує, що раманівський зсув не залежить від частоти (довжини хвилі) падаючого випромінювання. Тобто, чи збуджує молекулу зелена чи синя лазерна лінія, отримаємо однакову кількість піків та їх положення відносно один одного (але не обов'язково однакові відношення інтенсивностей), з комбінаційними зсувами, характерними для розсіювання молекули.

Ті коливання, для яких $\frac{\partial \alpha_{ij}}{\partial Q_k} \Big|_{Q_k=0} = 0$ (всі тензорні компоненти дорівнюють нулю) неактивні для раманівського розсіювання, а ті нормальні вібрації, для яких принаймні одна компонента $\frac{\partial \alpha_{ij}}{\partial Q_k} \Big|_{Q_k=0}$ відрізняється від нуля, будуть активні і можуть бути знайдені на спектрі. Порівняння симетричних та несиметричних коливань атомів в молекулі та їх зв'язок з поляризованістю вказано в Таб. 1.

Параметр	Тип молекули	
	X ₂	X-Y
Нормальні вібрації		
Дипольний момент	0	
Залежність дипольного моменту від нормальної координати		
Похідна дипольного моменту (в стані рівноваги)	$\left[\frac{\partial \mu}{\partial Q} \right]_0 = 0$	$\left[\frac{\partial \mu}{\partial Q} \right]_0 \neq 0$
Наявність в ІЧ спектрі	No	Yes
Форма еліпсоїда поляризованості		
Залежність поляризованості від нормальної координати		
Похідна поляризованості	$\left[\frac{\partial \alpha}{\partial Q} \right]_0 \neq 0$	$\left[\frac{\partial \alpha}{\partial Q} \right]_0 \neq 0$
Наявність в раманівському спектрі	Yes	Yes

Таб. 1. Фактори, що визначають ІЧ та комбінаційну активність коливань гомоядерних та гетероядерних двоатомних молекул.

Отже, в такому випадку ІЧ спектроскопія та комбінаційна доповнюють одна одну.

Метод раманівської спектроскопії (комбінаційного розсіяння світла, КРС) має такі переваги:

- неруйнівний;
- безконтактний;
- не вимагає підготовки матеріалу;
- аналіз твердих матеріалів і рідин, в певних випадках - також газів;
- досить швидкий аналіз (від секунд до хвилин);
- можливість роботи з водними розчинами (немає накладення сигналу води як в ІЧ спектрометрії);
- можливість віддаленого безконтактного аналізу (для систем з оптичним волокном);

- застосовуються недорогі кварцеві або скляні кювети (не потрібна сольова оптика як в ІЧ спектроскопії);
- можливість контролю температури / тиску / вологості в осередках, кріостатах; [4]
- можливість одночасного отримання спектрів КРС і фотолюмінесценції;
- можливість сканування по глибині зразка, прозорого в обраному діапазоні, з проникненням вглиб від 0.1 до кількох сотень мікрметрів (залежно від частоти джерела випромінювання);
- можливість картографування зразків з високою латеральною роздільною здатністю до дифракційного обмеження (для Раманівських спектроскопів з конфокальним мікроскопом);
- можливість комбінування КРС з ІЧ-Фур'є, системою вимірювання часу життя флуоресценції, скануючим електронним мікроскопом СЕМ / вимірюванням катодолюмінесценції, атомно-силовим мікроскопом АСМ.

Серед недоліків раманівської (КРС) спектроскопії, що обмежують застосування цього методу, можна виділити наступні:

- застосування лазера в якості джерела збуджуючого випромінювання може призвести до нагрівання і деградації зразка.
- інтенсивність ліній раманівського спектру багато менше інтенсивності джерела, тому для його реалізації необхідне потужне джерело випромінювання, а також приймач з високою чутливістю
- деякі сполуки флуоресціюють під впливом лазерного випромінювання.
- певні труднощі виникають при спробі визначити обертальні і обертально-коливальні спектри з високою роздільною здатністю

Раманівська спектроскопія широко застосовується в таких галузях:

- в нанотехнологіях для дослідження будь-яких типів наноструктур;
- в органічній хімії для вивчення механізмів реакцій і характеристики продуктів синтезу;
- в фармацевтиці при розробці та контролі виробництва таблетованих форм і кремів;
- в геології, мінералогії для вивчення дорогоцінних каменів, мінералів;
- при розробці і контролі різних виробничих процесів;
- при проведенні криміналістичної та митної експертизи;
- в біології для вивчення культур мікроорганізмів, клітинних культур, тканин і природних волокон.
- в косметології для оцінки ефективності косметичних засобів;

Також, раманівська спектроскопія є ідеальним інструментом *in-vivo* (наживо) досліджень біологічних зразків завдяки можливості роботи з водними розчинами, тому що не потребує підготовки зразка та є неруйнівною методикою.

1.3. Будова сперматозоїда

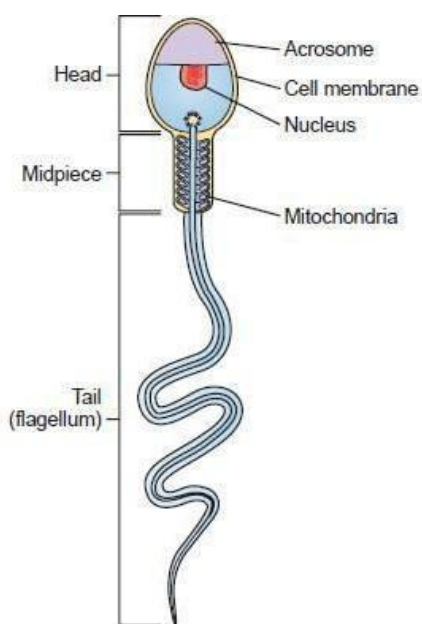


Рис. 3. Схематична будова сперматозоїда.

Сперматозоїди - це найменші клітини в людському організмі, але найбільш складні. Довжина одного сперматозоїда становить приблизно 55 мкм, з яких лише 5 мкм розмір голови та 4.5 мкм ший.

Хвостова частина складається з клітинної мембрани та аксонем.

Шия містить в собі велику мітохондрію, що синтезує АТФ та забезпечує рух джгутика (Рис. 3). Також функціональність мітохондрій може бути необхідною для підтримки активності акросому сперматозоїдів, акросомної реакції та цілісності хроматину. [5]

Голова сперматозоїда містить центросому, акросому та ядро.

Центросома - центр організації мікротрубочок, який забезпечує рух хвоста сперматозоїда.

Акросома містить 15 літичних ферментів, з яких основним є акрозин. Дуже важлива для запліднення, через акросомну реакцію: при контакті з яйцеклітиною акросома викидає свої ферменти назовні і розчиняє невелику ділянку оболонки яйцеклітини, завдяки чому утворюється невеликий «прохід» для проникнення сперматозоїда. Отже сперматозоїди, що не містять, або мають ущільнену акросому не можуть пройти належним чином через акросомну реакцію, а отже і не зможуть запліднити яйцеклітину [6]. Це один з критеріїв нормальності сперматозоїда за Крюгером [7].

Ядро – найголовніша частина сперматозоїда, оскільки несе в собі основний генетичний матеріал (ДНК) у вигляді хромосом. Всього в ядрі сперматозоїда одиничний (гаплоїдний) набір – 23 хромосоми, одна з яких може бути X, або Y, що відповідає статі ембріона.

1.4. Морфологічні аномалії

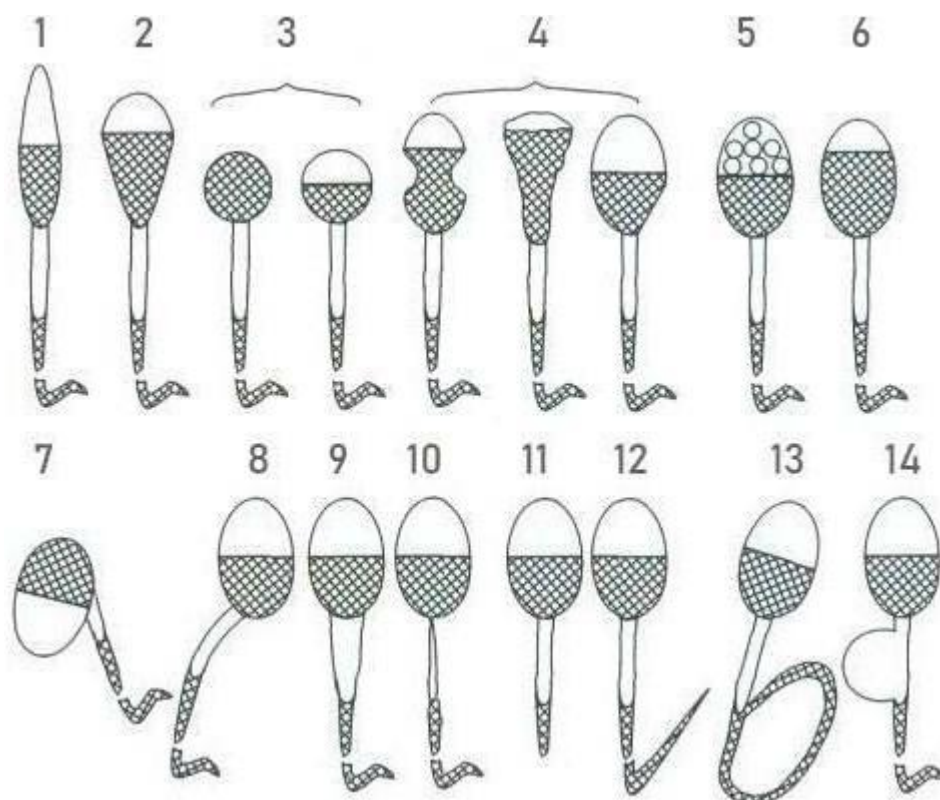


Рис. 4. Схематичне зображення патологічних форм сперматозоїдів в еякуляті: 1-6 – дефекти голови (1 – конічна, 2 – грушоподібна, 3 – кругла маленька, з або без акросоми, 4 – аморфна, 5 – з вакуолями, 6 – з маленькою акросомальною областю); 7-10 – дефекти шийки (7 – скручена шийка, 8 – асиметричне кріплення середньої частини, 9 – потовщена середня частина, 10 – потоншена середня частина); 11-13 – дефекти хвоста (11 – короткий хвіст, 12 – зламаний хвіст, 13 – скручений хвіст); 14 – цитоплазматична крапля займає більше третини голови.

Морфологічно аномальні сперматозоїди не використовуються при штучному заплідненні, але їх легше виявити ніж інші порушення, наприклад хромосомні. Такі сперматозоїди виключалися з дослідження. Окрім сперматозоїдів з маленькою акросомальною областю (або відсутністю акросоми) та сперматозоїдів з наявними вакуолями, оскільки вони візуально не відрізняються від нормальних. Вакуолі у сперматозоїді мають ядерну природу і пов'язані з порушенням конденсації хроматину та потенційним збільшенням сприйнятливості до пошкодження ДНК [8]. Можливі морфологічні аномалії за Крюгером вказано на Рис. 4, один сперматозоїд може містити більше ніж одну аномалію.

1.5. Хромосомні аномалії

Хромосомні аномалії є причиною різних розладів. Аномалії, які зачіпають аутосоми (22 парні хромосоми, однакові у чоловіків і жінок), зустрічаються частіше, ніж ті, що залучають статеві хромосоми (X і Y) [9]. Поділяються на:

- Чисельні аномалії:

- Трисомія (додаткова хромосома)
- Моносомія (відсутність хромосоми)
- Структурні аномалії:
 - Транслокації (аномалії, при яких ціла хромосома або сегменти хромосом неправильно об'єднуються з іншими хромосомами)
 - Делеції і дуплікації різних частин хромосом

Найчастіше від трисомії страждають 21а (синдром Дауна), 18та та 13та хромосоми. Причому трисомію 18ї знайти складніше ніж 21ї. Трисомія 13ї може бути материнського походження.

Аномалії статевих хромосом не такі важкі, як аналогічні прояви аутосомних аномалій. Наприклад відсутність однієї Х-хромосоми (моносомія Х) веде до специфічного синдрому (синдрому Тернера), а от відсутність аутосоми летальна. Але аномалії статевих хромосом також доволі розповсюджені. Як правило, порушення каріотипу у людини супроводжуються множинними вадами розвитку.

В даній роботі перевірка проводилась по статевим хромосомам та 18й аутосомі.

1.6. Методи визначення морфології та хромосомного складу сперматозоїдів

Морфологічно нормальні сперматозоїди зазвичай визначають за допомогою рутинних методів оцінки з використанням оптичної мікроскопії згідно з жорсткими критеріями Крюгера. На сьогоднішній день це єдиний широко застосовний метод. Так як він потребує людських ресурсів для аналізу, можливі помилки через людський фактор.

Для визначення критеріїв фертильності також проводять аналізи на зрілість акросоми та її наявність в голові сперматозоїда, наприклад аналіз зв'язування гіалуронової кислоти (НВА). Цей тест базується на попередньо досліджених властивостей гіалуронової кислоти (НА) - селективне зв'язування із зрілою спермою з інтактною акросомою та кращою морфологією. [10] Даний метод є суто лабораторним і руйнівним через те що акросома, прореагувавши з гіалуроновою кислотою вже не придатна для акросомної реакції з ооцитом.

Для визначення хромосомного складу сперматозоїда найчастіше використовують:

Метод проточної цитометрії – це методологія, яка використовується під час аналізу різномірної популяції клітин відповідно до різних молекул клітинної поверхні, розміру та обсягу, що дозволяє досліджувати окремі клітини. [11] Нажаль, використання методу проточної цитометрії окремо не дає точних результатів на клітинах сперматозоїдів.

Флуоресцентно-активоване сортування (FACS) – являє собою процес, при якому зразок суміші клітин сортується відповідно до їх характеристик розсіювання світла та флуоресценції у два або більше контейнерів. Даний метод широко застосовується у сільському господарстві для запліднення

корів, але є інвазивним через необхідне фарбування сперматозоїдів барвниками, а отже не використовується у клініках для штучного запліднення. [12]

Флуоресцентна гібридизація in situ (FISH) – денатурація та гібридизація ДНК флуоресцентними зондами. Найповніший метод аналізу з точки зору отриманої інформації, але суто лабораторний – майже повністю руйнує сперматозоїд і робить неможливим подальше його використання. [13]

Так як репродуктивна медицина має важливе значення не тільки в сільському господарстві, а й в медицині, були досліджені різноманітні методики для покращення процесу відбору ідеальних сперматозоїдів та визначення їх критеріїв фертильності.

Магнітно-активоване сортування клітин (MACS) відбирає сперму, яка не має ознак раннього апоптозу. Показником раннього апоптозу в спермі є наявність фосфатидилсерину на плазматичній мембрані. MACS використовує Анексин V-кон'юговані парамагнітні мікрогранули для зв'язування сперми, яка містить фосфатидилсерин. Сперматозоїди поміщують в проточну трубу та вмикають магнітне поле. При проходженні крізь трубу, сперматозоїди зв'язані мікрогранулами притягуються до магніта, а вільні можуть проходити далі. Дана методика доволі надійно відділяє нормальні сперматозоїди, але її ефективність залежить від використання допоміжних технік очищення еякуляту (наприклад техніка прямого спливання).

Сортування за Дзета потенціалом. Дзета-потенціал, або електрокінетичний потенціал, є зарядом на плазматичній мембрані зрілого сперматозоїда і становить від -16 мВ до -20 мВ [14]. Цей негативний заряд використовується для відокремлення зрілих сперматозоїдів, дозволяючи їм прилипати до позитивно зарядженої трубки центрифуги. Через кілька хвилин пробірку центрифугують, щоб видалити сперму, яка не прилипла до поверхні скла [15]. Ефективність даного методу з точки зору чистоти ізольованих сперматозоїдів рівна сучасному стандарту проточної цитометрії (приблизно 90%), але життєздатність сперматозоїдів становить лише близько 30%.

Сортування у мікрорідинних системах (Microfluidics Systems). У мікрорідинній системі рухливі сперматозоїди відокремлюються від нежиттєздатних завдяки здатності рухатись проти ламінарного потоку. Живі та рухливі сперматозоїди можуть рухатись в оберненому напрямку від потоку та збираються далі в окремій камері. Проблема полягає в тому, що цей метод сортування може вмістити лише невеликий обсяг зразка за один підхід. [16]

Це пояснюється властивістю конструкції та механізмом мікрорідинних систем, де певний пластинчастий потік та дифузія є керованими лише в мікрометрових каналах. Це робить техніку неефективною при великомасштабному сортуванні сперматозоїдів, наприклад, для розведення великої рогатої худоби. Але життєздатність сперматозоїдів в мікрорідинних системах може досягти майже 95%. [17]

2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

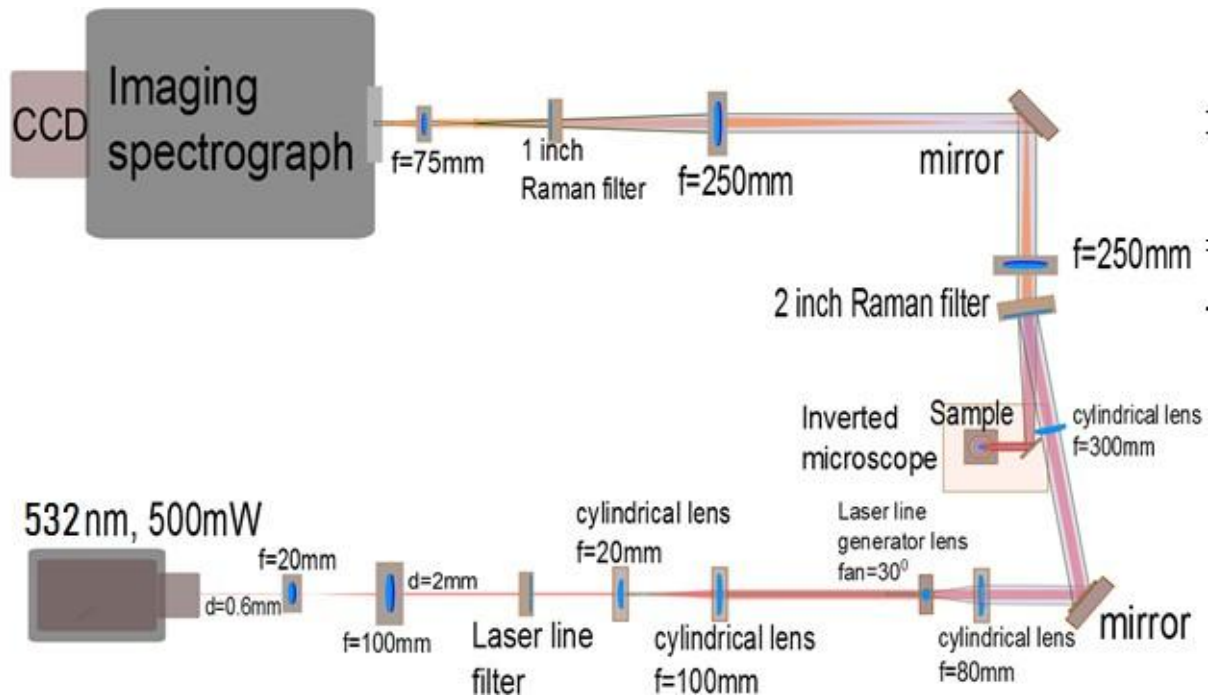


Рис. 5. Схема раманівського спектрографа.

2.1. Параметри установки

Характеристики використовуваного обладнання, схема якого вказана на Рис. 5:

- збудження зразка проводиться на довжині хвилі 532 нм та 785 нм.
- роздільна здатність монохроматора 0,1 нм ($\sim 2 \text{ см}^{-1}$).
- спектральний діапазон $200 - 2700 \text{ см}^{-1}$.
- роздільна здатність оптомеханічного пристрою для сканування по зразку становить 0.625 мкм.
- об'єктив мікроскопа – Zeiss C-Plan-Apochromat 40x, 1.0NA, Water Imersion.
- поле зору об'єктива $d = 0.5 \text{ мм}$, $S=0,19625 \text{ мм}^2$

Для можливості отримання видимого і контрастного зображення використовувалась техніка Oblique Illumination (непряме освітлення зразка одночасно з екрануванням прямих променів. Зображення формують заломлені та розсіянні промені).

Для запису спектрів використовувалось збудження лазерним випромінюванням на довжині хвилі 532 нм потужністю 7 мВт, експозиція 10 с на одну просторову точку.

$$\text{Густина потужності } W=0,144 \cdot 10^9 \frac{\text{Вт}}{\text{мм}^2}$$

Результуюча густина потужності не досягає межі пошкодження зразка, але є достатньою для запису спектрів з достатнім рівнем співвідношення сигнал-шум. [18]

2.2. Метод прямого спливання

Swim up метод широко застосовується у лабораторіях для відбору сперматозоїдів за своєю рухливістю та здатністю впливати з сім'яної плазми. Саме рухливі сперматозоїди вважаються нормальними та можуть в подальшому бути застосовані для штучного запліднення. Також, в цей спосіб можна відділити чисті сперматозоїди від інших складових еякуляту, що саме і було використано в даній роботі.

Протокол даного методу складається з таких дій:

2 мл культурального середовища поміщають над 1 мл сперми, обережно нашаровуючи його, в кожную пробірку. Пробірки поміщають в інкубатор, нахиливши їх під кутом близько 45 °, та залишають при 37 ° C на 30-60 хв до появи каламутного прошарку на межі еякуляту – середовище (як середовище було використано культуральне середовище фірми Origio, Sequential Series, без фенольного барвника). Утворений каламутний шар відбирається в окрему пробірку – це рухомі сперматозоїди.

У даній роботі після методу прямого спливання застосовувалось центрифугування при 0.8g 20 хв для збільшення концентрації сперматозоїдів в речовині. При цьому сперматозоїди опускалися на дно пробірки, а рідину у верхній частині пробірки зливали.

Так як метод описаний в даній роботі знаходиться на стадії розробки, зразок досліджується у фіксованому стані. Фіксація здійснювалась після нанесення рідини що вміщує сперматозоїди на скло CaF₂. Після повного висихання зразок оброблявся свіже приготованою сумішшю метанолу та оцтової кислоти у відношенні 3:1.

2.3. Методи обробки даних

2.3.1. Калібрування частоти в спектрах

Одна з найпопулярніших проблем в аналізі спектрів, коли експеримент триває протягом тривалого часу, і ми не маємо можливості відкалібрувати нашу систему, це те, що відбувається зміщення по частоті. Це може бути спричинено людським фактором та роз'юстуванням системи внаслідок температурного розширення, тощо. Зазвичай зміщення не є великим і може становити дробові частини пікселів. Положення ускладнюється тим, що шкала є нелінійною в межах спектрального діапазону.

Вирішення проблеми було реалізовано в такий спосіб:

- Апроксимуємо пік по якому робимо зміщення Лоренціаном.

$$f(x; x_0; \gamma, I) = \frac{I}{1 + \left(\frac{x - x_0}{\gamma}\right)^2} \quad \#(10)$$

- Частота даного піка може бути визначена з літературних даних, що полегшить наступний аналіз, наприклад в даному випадку був взятий пік CaF_2 з частотою 321 cm^{-1} .
- Визначаємо частоту яка відповідає пікселю де знаходиться максимум (x_0)
- Знаходження відповідності між пікселем та частотою відбувається за рахунок інтерполяції прямою відрізком з 2х точок між якими знаходиться максимум.
- Розраховуємо різницю частоти між поточним максимумом та тим до якого відбуватиметься зсув – отримуємо $\Delta\nu = \text{const}$ на всьому частотному діапазоні.
- Віднімаємо від кожного значення частоти – отримуємо новий діапазон частот.
- Нові положення (в пікселях) що відповідають частотам $\nu - \Delta\nu$ шукаємо оберненою дією, також інтерполяцією.

Отримані значення пікселів відповідають правильному положенню піків, але не є цілими. Знаходження інтенсивності в нецілому пікселі досягається також методом інтерполяції.

2.3.2. Метод головних компонент (PCA)

Метод головних компонент один з найпопулярніших методів для аналізу даних, що використовується для зменшення розмірності матриці та подальшої кластеризації. [19] Матриця змінних X розмірністю $(I \times J)$ розкладається за формулою (11) на матрицю рахунків T розмірністю $(I \times A)$, матрицю навантажень P розмірністю $(J \times A)$, та матрицю залишків E розмірністю $(I \times J)$.

$$X = TP^t + E = \sum_{a=1}^A p_a^t + E \quad (11)$$

де $t_a (a=1, \dots, A)$ – нові, формальні змінні, A – кількість головних компонент, $A \leq J$ (в даній роботі було покладено $A=J$).

Матриця рахунків T дає нам проекції вихідних зразків на підпростір головних компонент. Рядки t_1, \dots, t_I матриці T - це координати зразків в новій системі координат. Стовпці t_1, \dots, t_A матриці T - ортогональні і представляють проекції всіх зразків на одну нову координатну вісь.

Побудувавши графік в координатах (t_i, t_j) отримаємо графік рахунків. Близькість двох точок означає їх схожість, тобто позитивну кореляцію. Точки, розташовані під прямим кутом, є некоррельовані, а розташовані діаметрально протилежно - мають негативну кореляцію.

$$T^t T = \Lambda = \text{diag}\{\lambda_1, \dots, \lambda_A\} \quad (12)$$

$\lambda_1 \geq \dots \geq \lambda_A \geq 0$ – це власні значення. Вони характеризують важливість кожної компоненти. Графіки рахунків часто використовується для візуалізації кластеризації даних.

Матриця навантажень P - це матриця переходу з початкового простору змінних x_1, \dots, x_j в простір головних компонент. Кожен рядок матриці P складається з коефіцієнтів, що пов'язують змінні t і x . Кожен стовпець P - це проекція відповідної змінної x_j на нову систему координат.

Аналізуючи графік навантажень аналогічно графіку рахунків можна також зрозуміти, які змінні пов'язані, а які незалежні.

Як правило при розкладанні знятих спектрів по PCA компонентам виділяють лише декілька перших компонент, не аналізуючи останні через те що вони вже не містять корисної інформації.

2.3.3. Мультиплікативне нормування сигналу (MSC)

Методи попередньої обробки даних (preprocessing) у коливальній спектроскопії можна розділити на дві категорії: методи фільтрації та методи, базовані на моделях. [20] Методи фільтрування, такі як обчислення других похідних, або нормування на усереднений спектр просто перетворюють спектри у вигляд, зручний для аналізу, усуваючи небажані типи варіацій. Методи, засновані на моделях, дозволяють кількісно визначати і розділяти різні варіації спектрів пов'язані з фізичними чинниками та просторовим хімічним складом. Отже, відфільтрована інформація не втрачається, та отримуються статистичні оцінки математичних параметрів, задіяних у фільтруванні, що можуть бути використані для вивчення різних ефектів. Виведення моделі MSC корекції базується на законі Бугера-Ламберта-Бера, що буде розглянуто нижче.

За законом для прозорих зразків, що містять однорідні поглинаючі світло хімічні компоненти, поглинання A :

$$A(\lambda) = k(\lambda) \cdot c \cdot b \quad (13)$$

де $k(\lambda)$ - це поглинаюча здатність для конкретного компонента, специфічного для хвилі λ b - довжина оптичного шляху, c - концентрація світло поглинаючих хімічних компонент у зразку.

Для J світло поглинаючих компонент, закон Бугера-Ламберта-Бера можна записати як суперпозицію поглинань кількох компонентів:

$$A(\lambda) = \sum_{j=1}^J k_j(\lambda) \cdot c_j \cdot b \quad (14)$$

де $k_j(\lambda)$ - спектр, а c_j - концентрація компонента j .

Припускаємо, що довжина оптичного шляху b є порівняно однаковою для всіх компонент. Це припущення може бути справедливим для досить однорідних зразків.

Вимірний спектр поглинання $A(\lambda)$ може бути виражений як середнє значення $x(\lambda)$ усіх спектрів у наборі даних плюс відхилення $\Delta k_j(\lambda)$ від цього середнього:

$$k_j(\lambda) = x(\lambda) + \Delta k_j(\lambda) \quad (15)$$

Підставляючи у (13) маємо:

$$A(\lambda) = \sum_{j=1}^J k_j(\lambda) \cdot b = \sum_{j=1}^J \bar{k}(\lambda) + \sum_{j=1}^J \Delta k_j(\lambda) \cdot b \quad (16)$$

Чистий біохімічний спектр $z(\lambda)$, який ми збираємось оцінити, можна представити як суму всіх теоретично доступних складових спектрів:

$$z(\lambda) = \sum_{j=1}^J k_j(\lambda) \quad (17)$$

де сума концентрацій дорівнює 1:

$$\sum_{j=1}^J k_j = 1 \quad (18)$$

Ця умова є важливою, оскільки це означає, що складові спектри нормуються таким чином, що, якщо їх помножити на відповідні концентрації, вони складатимуть 100% у кожному вимірюваному спектрі. Підставляючи умову (18) в рівняння (16) остаточно отримуємо:

$$A(\lambda) = \bar{k}(\lambda) \cdot b + \sum_{j=1}^J \Delta k_j(\lambda) \cdot b \quad (19)$$

У всіх випадках, коли загальна форма вимірюваного спектра $A(\lambda)$ близька до середнього спектра \bar{k} ми можемо замінити рівняння (19) статистичною моделлю:

$$A(\lambda) = \bar{k}(\lambda) \cdot b + e(\lambda) \quad (20)$$

де залишок $e(\lambda)$ визначається як:

$$e(\lambda) = b \cdot \sum_{j=1}^J \Delta k_j(\lambda) \quad (21)$$

При додаванні базової лінії отримуємо модель мультиплікативного нормування сигналу:

$$A(\lambda) = a + \bar{k}(\lambda) \cdot b + e(\lambda) \quad (22)$$

Невідомі параметри a і b оцінюються звичайною або зваженим методом найменших квадратів. Спектр корелюється відповідно до:

$$A_{corr}(\lambda) = \frac{A(\lambda) - a}{b} \quad (23)$$

У багатьох ситуаціях, у спектрах присутні базові варіації, які неможливо представити прямою лінією. Наприклад, якщо у спектрах присутні явища флуоресценції, то модель мультиплікативного нормування сигналу може бути розширена базовою лінією з довільним нахилом, квадратичним членом або членами вищого поліноміального порядку:

$$A(\lambda) = a + \bar{k}(\lambda) \cdot b + d_1 \lambda + d_2 \lambda^2 + \dots + d_n \lambda^n + e(\lambda) \quad (24)$$

Тоді корельовані дані маємо у вигляді:

$$A_{corr}(\lambda) = \frac{A(\lambda) - a - d_1 \lambda - d_2 \lambda^2 - \dots - d_n \lambda^n}{b} \quad (25)$$

В даній роботі в якості базової варіації було використано спектр флуоресценції \tilde{d} та базову лінію:

$$A(\lambda) = a + \lambda \cdot b + \tilde{d} \cdot c + e(\lambda) \quad \#(26)$$

Кореляція проводилась згідно:

$$A_{corr}(\lambda) = \frac{A(\lambda) - a - \tilde{d} \cdot c}{b} \quad \#(27)$$

2.3.4. Метод перевірки

Методами перевірки можуть слугувати як інші види спектроскопії так і хімічні методи. Майже всі вони руйнують зразок, отже було обрано найбільш простий в даній ситуації але дуже точний метод (97%) флуоресцентної гібридизації *in situ* (FISH). Використання FISH дозволяє визначати не тільки статеві хромосоми, а також різноманітні хромосомні аномалії: делеції, транслокації, ампліфікації, тощо. Порядок дій описаний нижче, а також проілюстрований на Рис. 6:

- Денатурація ДНК в присутності формаміду за $T=70$ °С.
- Додавання зондів. До складу ДНК-зондів входять нуклеозиди, мічені флюорофорами (пряме мічення) або такими кон'югатами, як біотин або дігоксігенін (непряме мічення). При прямому міченні зв'язані з мішенню ДНК-зонди можна спостерігати за допомогою флуоресцентного мікроскопа відразу по завершенні гібридизації. У разі непрямого мічення необхідна додаткова процедура фарбування, в ході якої біотин виявляють за допомогою флуоресцентно-міченого авідину або стрептавідину, а дігоксігенін - за допомогою флюоресцентно-мічених антитіл.
- Гібридизація (12год)
- Кілька стадій промивання видаляють все негібридизовані або частково гібридизовані зонди.
- Дослідження на флуоресцентному мікроскопі, який здатний збуджувати барвник і записувати зображення. Якщо флуоресцентний сигнал є слабким, може знадобитися посилення сигналу, щоб перевищити поріг виявлення мікроскопа.

У даній роботі FISH здійснювався сертифікованою лабораторією, перевірка проводилась по X, Y та 18 хромосомах так як 21-а, 13-та та 18-та хромосоми найбільш схильні до подвоєння.

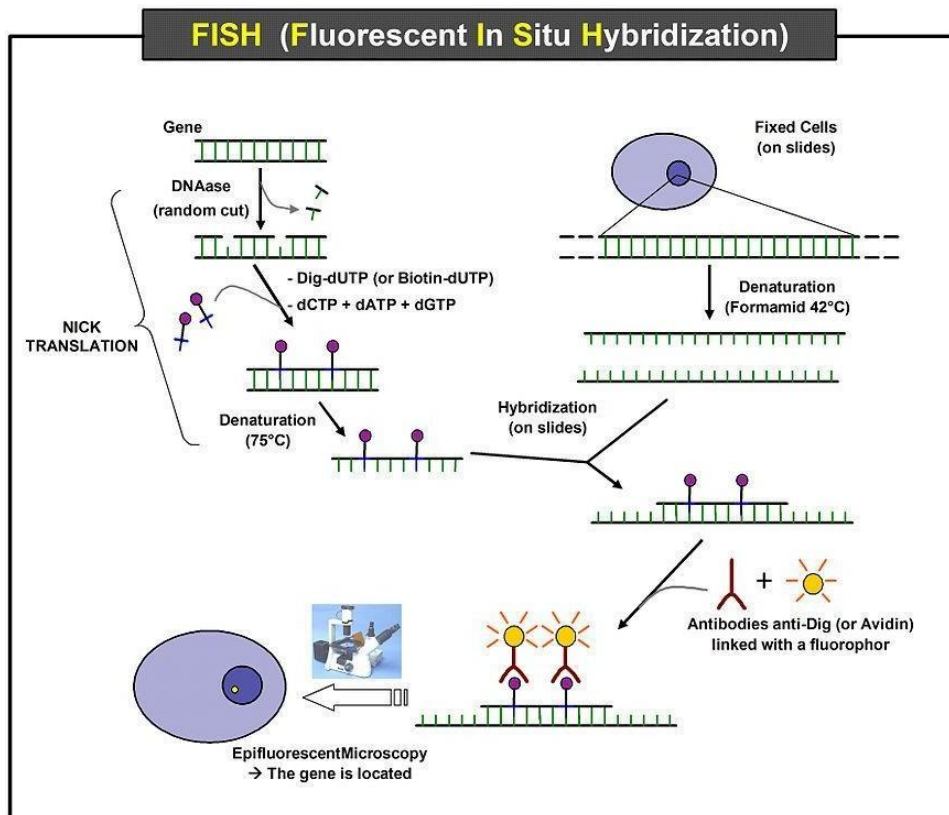


Рис. 6. Схематичне зображення процесу флуоресцентної гібридизації in situ.

3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

3.1. Постановка задачі

За допомогою раманівської спектроскопії ідентифікувати по спектру наявність акросоми, ядра, мітохондрії, що є ознаками морфологічно нормальних сперматозоїдів, та каріотип сперматозоїда. Визначити хімічні сполуки, що відповідають складу хімічних з'єднань в окремих областях клітини. [Extended multiplicative signal correction in vibrational spectroscopy, a tutorial/ N. Kristian Afseth, A. Kohler// 2012](#)

[21] Провести обробку результатів за описаними вище методами. Отримати статистичні оцінки результатів та перевірити їх за допомогою лабораторного аналізу FISH.

3.2. Приготування зразка



Рис. 7. Розділення сперматозоїдів методом прямого спливання.

Еякулят був очищений за допомогою методу прямого спливання (Рис. 7). Таким чином були відібрані нормальні рухливі сперматозоїди. Потім зразок центрифугувався 20 хв при 0.8 g. Були випробувані декілька методів фіксації – формальдегідом, метанолом з оцтовою кислотою у відношенні 3:1. Фіксація формальдегідом потребувала промиття зразку розчином натрій-фосфатного буфера (PBS). PBS Містить велику кількість солей: NaCl, KCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄ і використовується тому що нетоксичний для клітин, але після висихання формує кристали на поверхні зразка, що в свою чергу потребує промиття дистильованою водою. Другий спосіб має гірше спектральне відображення даних, але був вибраний через можливість зробити FISH перевірку після отримання спектральної інформації з раманівського спектрографа.

Перед записом спектрів була сфотографована область зразка в якій вестимуться дослідження (Рис. 8), відскановані сперматозоїди нумерувалися, отже після аналізу можливо буде точно вказати сперматозоїди з можливими хромосомними аномаліями.

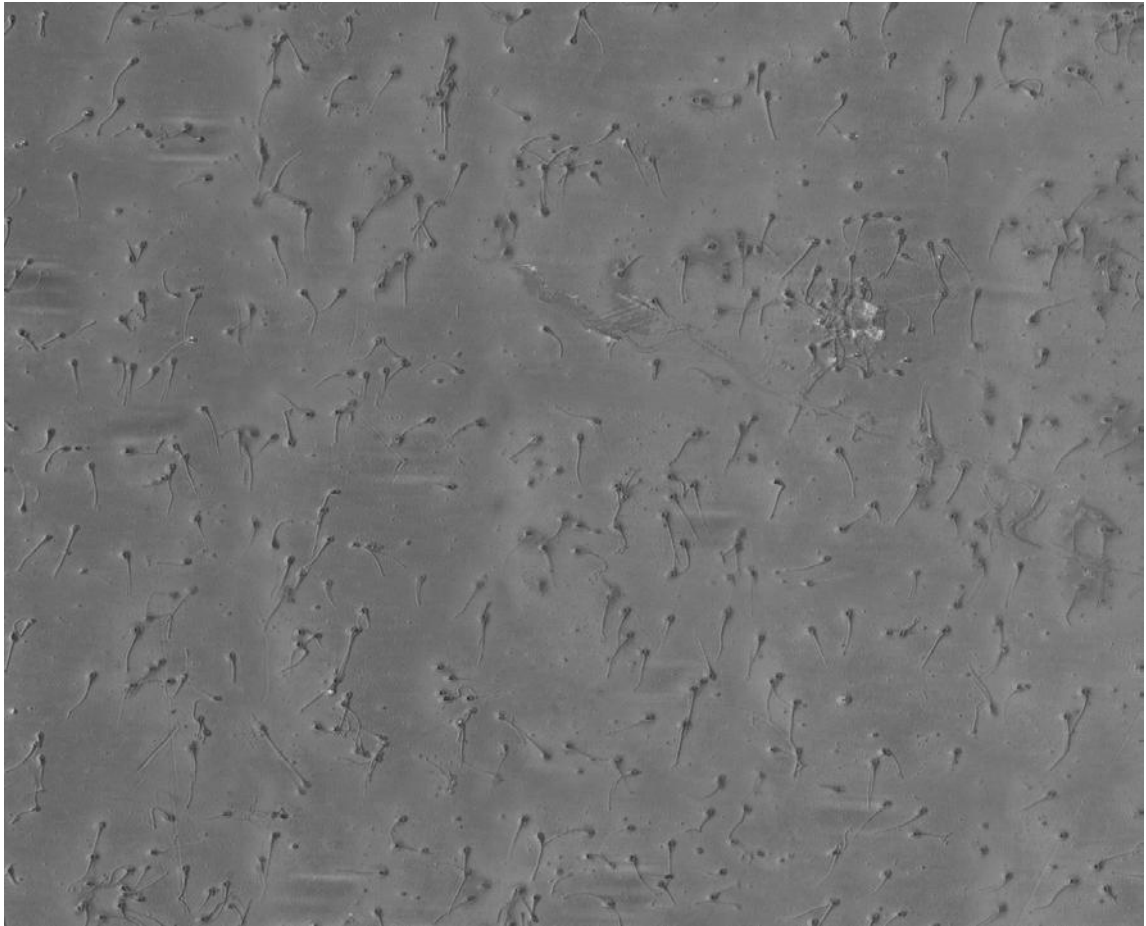


Рис. 8. Зображення дослідженої області зразка записане за допомогою техніки *Oblique Illumination*.

3.3. Попередня обробка даних

Згідно методу описаному в розділі 3 була проведена процедура частотного калібрування спектрів. Результати представлені на Рис. 9. Це дало змогу коректно застосовувати методи аналізу великих масивів даних,

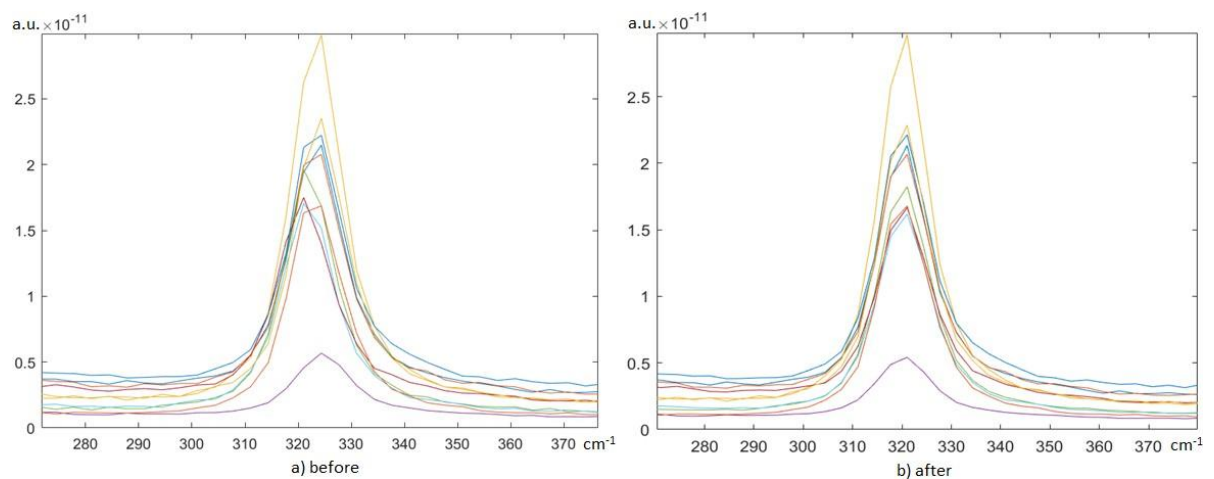


Рис. 9. Порівняння сукупності спектрів *a)* до частотного калібрування спектрів *b)* та після частотного калібрування спектрів.

зокрема, метод головних компонент. З рисунка видно, що після проведення процедури корекції спектральних даних положення піку 321 cm^{-1} CaF_2 не змінюється для різних просторових точок зразка.

За допомогою методу PCA також було зменшено рівень шумів отриманих спектральних даних [22]. Запропоновано автоматизацію обробки масиву даних за допомогою алгоритму наведеному нижче:

```
[coeff, score, ~] = pca(input_data, 'Centered', false);  
pc = k;  
data_corrected = score(:, 1:pc) * coeff(:, 1:pc)';
```

Функція `pca` перетворює вхідну матрицю `input_data` на матрицю рахунків `coeff` і матрицю навантажень `score`. Параметр 'Centered' визначає чи будуть компоненти центровані (якщо ні, то будемо мати усереднений спектр першою головною компонентою). Значення даного параметра вибираються за побажанням користувача.

`k` – кількість нових головних компонент `pc`, що використовується надалі для отримання поглажених спектрів `data_corrected` шляхом перемноження матриці рахунків і транспонованої матриці навантажень.

У цьому випадку ми перетворюємо матрицю рахунків та матрицю навантажень назад у матрицю даних, але з меншою кількістю головних компонент. Як наслідок, випадковий шум та можлива реєстрація напівпровідниковим фотодетектором космічних високоенергетичних променів та елементарних частинок (спайки), які часто псують дані, видаляються. Єдина проблема може полягати в тому, що в кожному новому експерименті використовуються різні кількості цих основних компонент. Отже, для використання цього методу в автоматичному дослідженні необхідно визначати критерії кількості основних компонент.

Результати обробки даних представлено на Рис. 10.

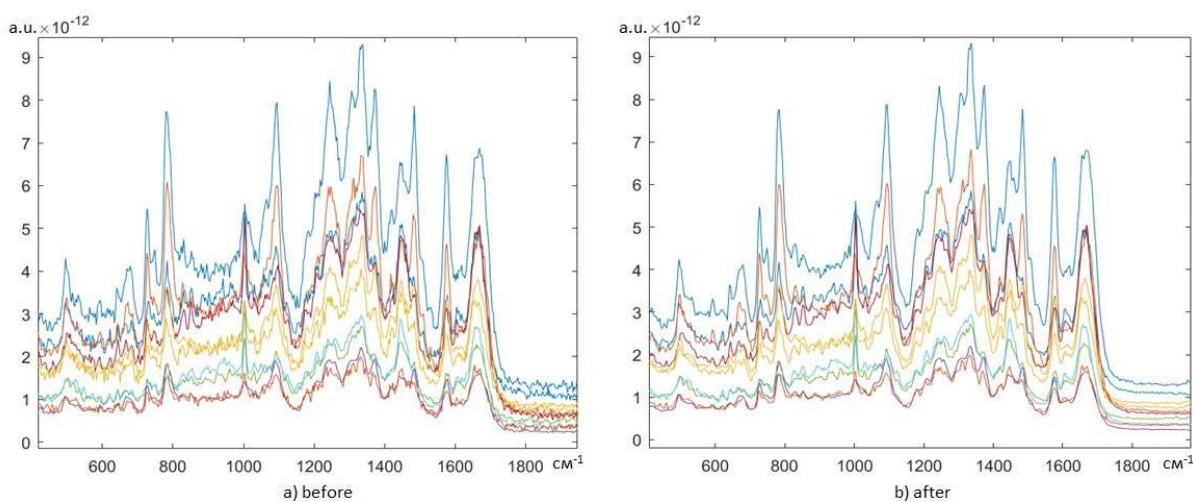


Рис. 10. Порівняння сукупності спектрів а) до застосування методу головних компонент для зменшення рівню шумів б) та після.

Також, згідно методу, описаному в розділі 3 проведено мультиплікативне нормування масиву спектрів. Зокрема, процедура включала відокремлення флуоресцентного фону. Це дало змогу будувати за інтенсивністю характерних піків карти відносного просторового розподілу хімічних речовин в межах області сканування. Результати нормування спектрів представлено на рис. 11.

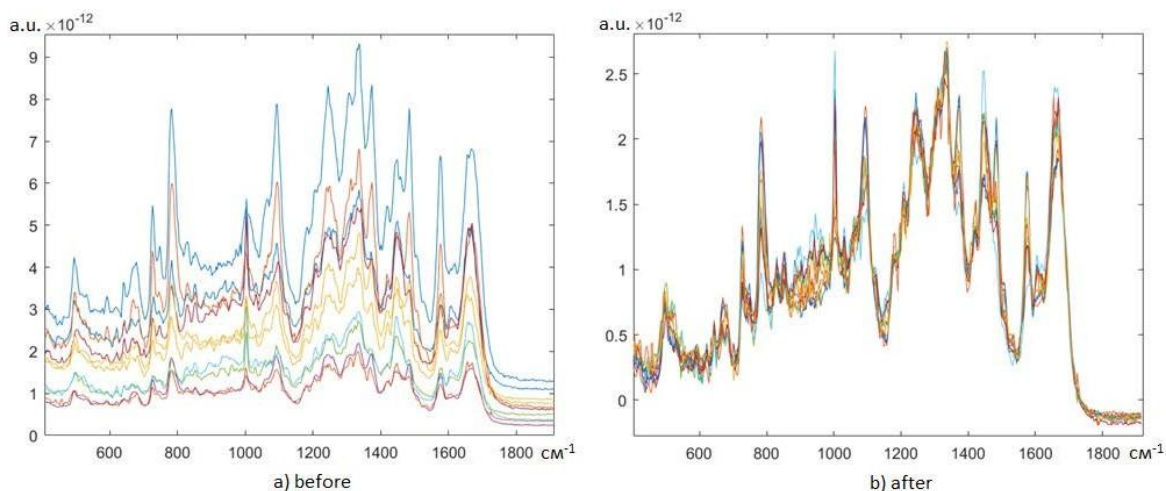


Рис. 11. Порівняння сукупності спектрів а) до частотного нормування спектрів методом MSC б) та після.

3.4. Класифікація спектрів

На Рис. 12 подано типовий спектр з області голови сперматозоїда, отриманий методом конфокальної мікроскопії комбінаційного розсіяння світла. Так звана “область відбитків пальців” (область, що містить головні характерні піки органічних речовин) містить велику кількість, в тому числі,

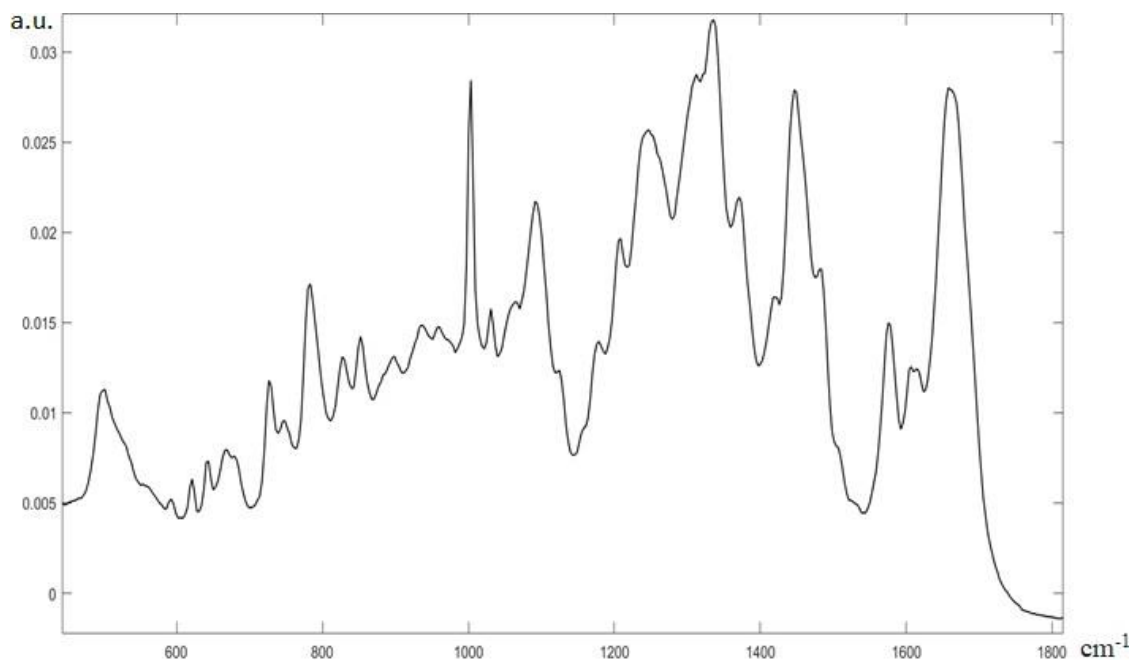


Рис. 12. Усереднений спектр сперматозоїда.

взаємно перекритих піків, що характеризують валентні та деформаційні коливання молекул - складових хімічних речовин клітини. Таким чином, аналізуючи інтенсивності піків в певній спектральній області можна зробити висновок про хімічний склад в просторовій області, з якої отримано спектр. В роботі, поєднуючи цю методику з просторовим скануванням в межах досліджуваного зразка, отримано карти морфологічного розподілу органел в сперматозоїді.

Отже, розглянемо основні хімічні сполуки, що є складовими органел клітини (сперматозоїда) та опишемо основні піки на спектрах комбінаційного розсіяння світла (Таб. 2).

Хвильове число, см-1	Пояснення
1660	C=C (ліпіди, фосфоліпіди), А, Т, G, С, жирні кислоти, амід I (білки)
1615	С, Т, деформаційні коливання (СС, CN, СО)
1576	А, G, NADH, АТФ
1547	Зв'язана та вільна NADH, пролін
1509	А, С
1481	А, G, амід I, СН
1447	CH ₂ CH ₃ деформаційні
1420	CH ₂ ножицеві коливання, А, G, СН деформаційні
1371	А, G, Т, С, СН (білки)
1336	DNA пуринові основи, А, G, амід III, CH ₂
1247	амід III, G, С, ліпіди, CN
1209	А, Т, С, амід III, фенілаланін, деформаційні коливання (СН, СО)
1179	А, С, G, Т, фенілаланін
1155	каротиноїди, СС, CN розтягувальні коливання білків
1126	цитохром с
1092	ліпіди, CN в білках, PO ₂
1061	CN розтягувальні, СС

1031	Фенілаланін, CH ₂ CH ₃ у колагені та фосфоліпідах, пролін
1003	Фенілаланін, зв'язана та вільна NADH
852	DNA пуринові основи, Т, пролін
827	OPO в DNA/RNA, пролін, Т
783	U, T, C, OPO
750	Цитохром с, U, C
726	Нуклеїнові кислоти, А, СС, ліпіди, CS (білки), CH ₂

Таб. 2. Співвідношення наявних на спектрах піків з хімічними речовинами та коливаннями зв'язків, яким вони відповідають; позначення: А – adenine, С – cytosine, G – guanine, T – thymine

Акросома містить в собі такі хімічні речовини як гіалуронідаза та акрозин, хімічні формули яких показані на Рис. 13. Отже, пошук відповідних піків буде вестися по наявності відповідних хімічних зв'язків.

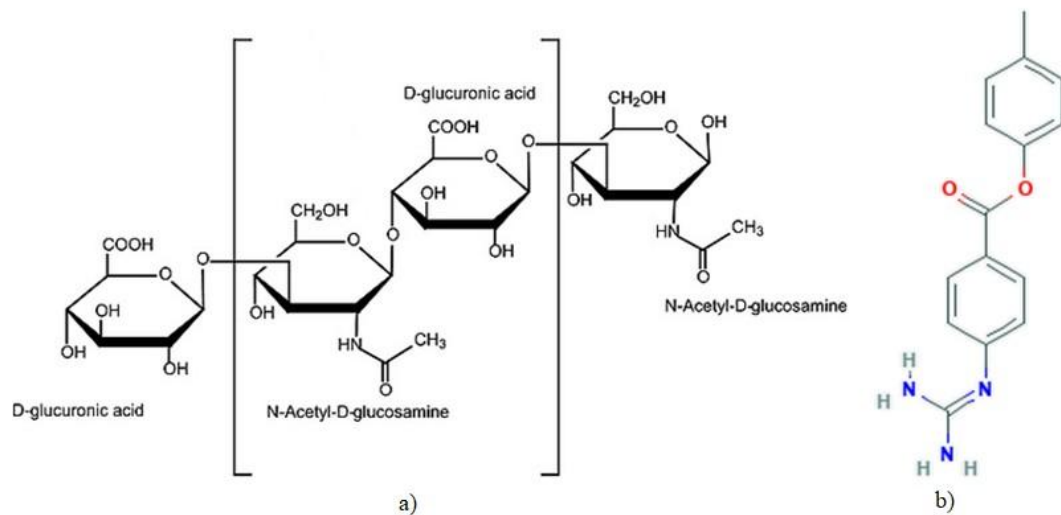


Рис. 13. Хімічні сполуки присутні в акросомі сперматозоїда а) гіалуронідаза б) акрозин.

Мітохондрія містить мітохондріальне РНК та деякі білки: цитохром с, b, NADH комплекс, АТР синтаза. В оболонці містяться каротиноїдоксигенази – ферменти, що розщеплюють каротиноїди.

РНК складається з нуклеїнових кислот – аденіну, гуаніну, цитозину та урацилу. В ДНК замість урацилу стоїть тимін. На Рис. 14 показано хімічні формули сполук, присутніх в мітохондрії.

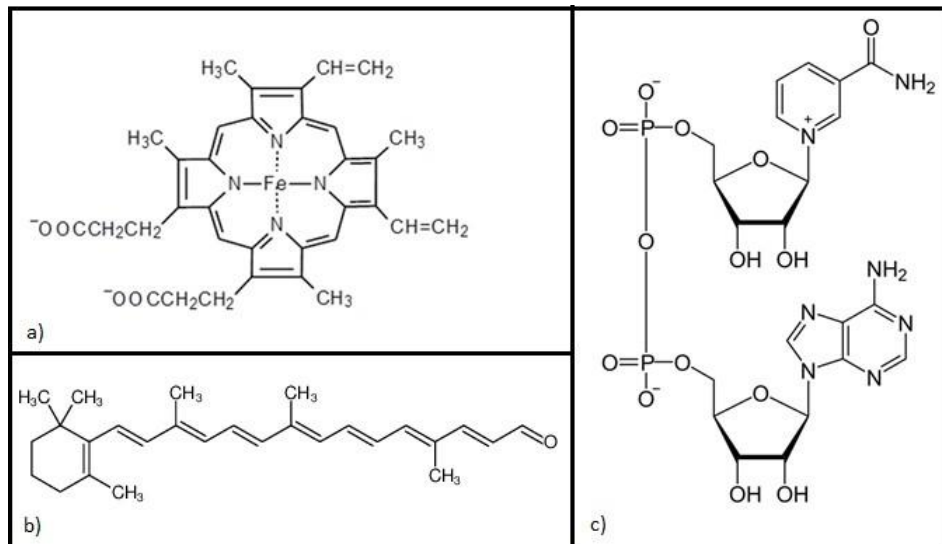


Рис. 14. Хімічні сполуки присутні в мітохондрії сперматозоїда а) цитохром с б) каротиноїдоксигеназа с) NADH комплекс.

Хромосоми (ДНК) представлені нуклеїновими кислотами - аденін, гуанін, цитозин та тимін (Рис. 15). В голові сперматозоїда ядро не має визначеного положення, що вносить додаткові складнощі при знятті спектрів.

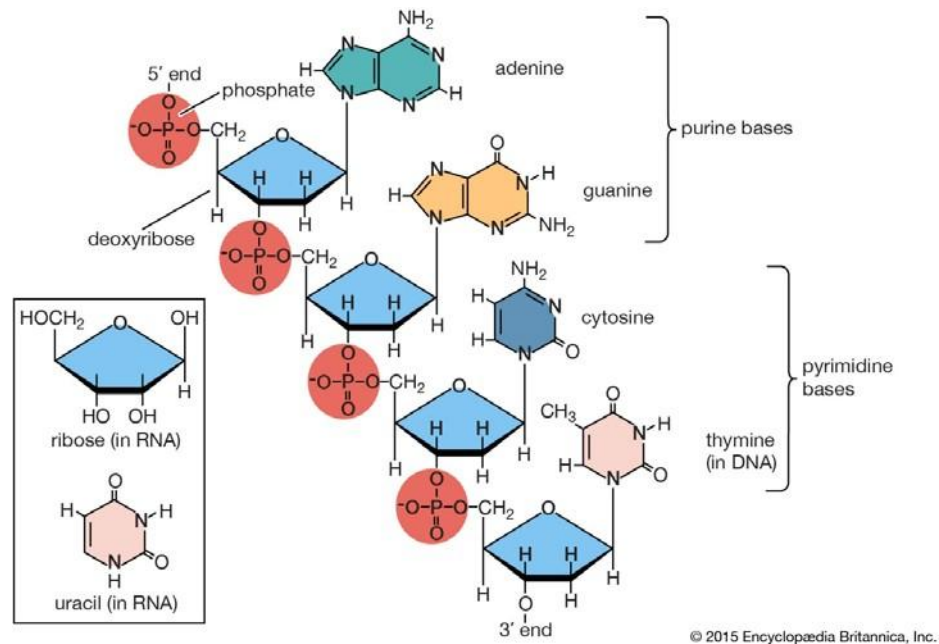


Рис. 15. Хімічний склад ДНК.

3.5. Аналіз результатів

Методом сканування по просторовій області зразка та співставлення відповідних точок з оптичним зображенням окремої клітини (Рис.16 б) виокремлено спектри, що відповідають положенням деяких її функціональних частин – ядру, розміщеному в центральній частині голови сперматозоїда; мітохондрії, розміщеної у верхній хвостовій частині; акросомі (верхня частина голови) та хвісту. Отримано порівняльну спектральну характеристику (Рис.16 а). Відповідно до цих даних та враховуючи

порівняльну таблицю піків функціональних груп хімічних речовин, ми можемо запропонувати критерії визначення морфологічного розміщення органел кожного окремого сперматозоїда.

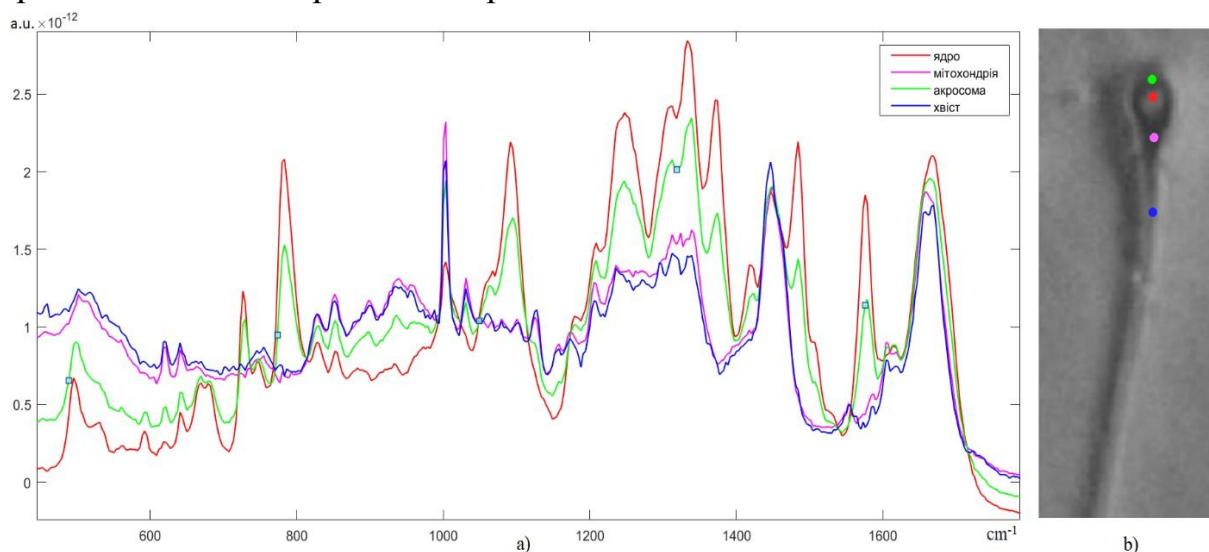


Рис. 16. а) спектри записані в різних просторових точках сперматозоїда б) відповідність спектрів частинам сперматозоїда.

Для знаходження інтенсивності піків не перекритих з сусідніми визначалось різницеве значення інтенсивності в максимумі піка до значення в найближчому мінімумі. Тоді як для перекритих піків проводилась процедура апроксимації спектру у визначеній області групою піків, що описуються функцією Лоренца. Для аналітичних розрахунків використовувався програмний продукт - MATLAB. В процесі оптимізації параметри піків за критерій взято мінімізацію середньоквадратичного відхилення аналітичної кривої від експериментальної. Спрощена частина програмного коду представлена нижче:

```

for i = r1:r2
    G = ones(1, pnum);
    y = input_data(i, x1:x2);
    modelfun = @(c) G*(c(:,1) ./ (1 + ((x - c(:,2))
    ./ c(:,3)).^2) + c(:,4)) - y;
    C = lsqnonlin(modelfun, C0, lb, ub, options);
end

```

Функція `lsqnonlin` розв'язує систему нелінійних рівнянь методом найменших квадратів. `G` - матриця-рядок з одиничними елементами, для побудови `modelfun` - функції лінійної комбінації `pnum` піків. Оптимізується різницева функція аналітичної кривої та експериментальних даних. `y` - вхідні спектральні дані *i*-ї просторової точки, обмежені спектральним діапазоном `x1:x2`. `C0` - нульове наближення для параметрів апроксимації, `lb`, `ub` - відповідно нижня та верхня границі зміни значень параметрів. `C` - матриця оптимізованих значень параметрів піків.

Таким чином, для визначення інтенсивності піків на спектрі використано процедуру апроксимації та написано програмний код, що автоматично виконує цю дію. І далі, для побудови карт просторового розміщення функціональних груп клітини, бралися значення інтенсивностей характерних груп піків.

Для знаходження акросоми було визначено піки, що відповідають C-N коливанням (Рис.17 а), в великій мірі присутніх у ферментах, що містить в собі акросома. За спектральними інтенсивностями сукупності даних піків було відокремлено та візуалізовано акросому.

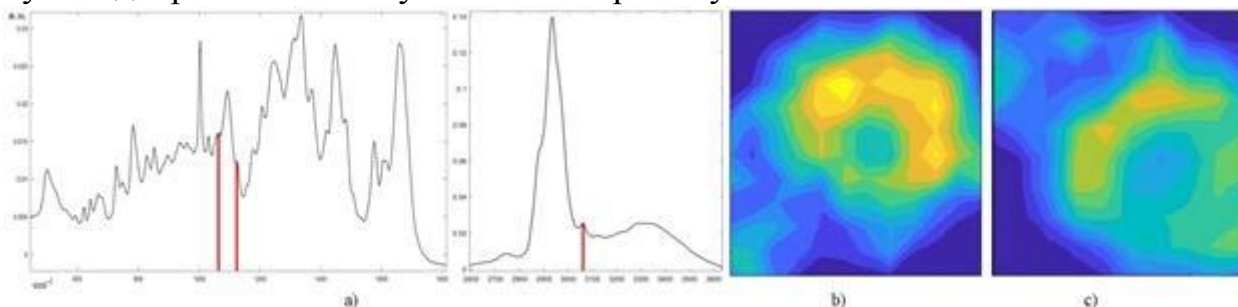


Рис. 17. а) піки, що відповідають C-N коливанням, наявних в хімічних сполуках акросоми б) сперматозоїд з чітко вираженою акросомою с)сперматозоїд з слабо вираженою або відсутньою акросомою.

На Рис. 17 с можна помітити, що інтенсивності піків C-N коливань малі відносно області цитоплазми, або зовсім не ідентифікуються. Це означає, що акросома слабо виражена, або її немає.

Для знаходження мітохондрій були знайдені відмінності на спектрах в конкретних піках, а саме 1003 cm^{-1} – NADH, 1155 cm^{-1} – каротиноїдоксигеназа, 1547 cm^{-1} – NADH (Рис.18 а).

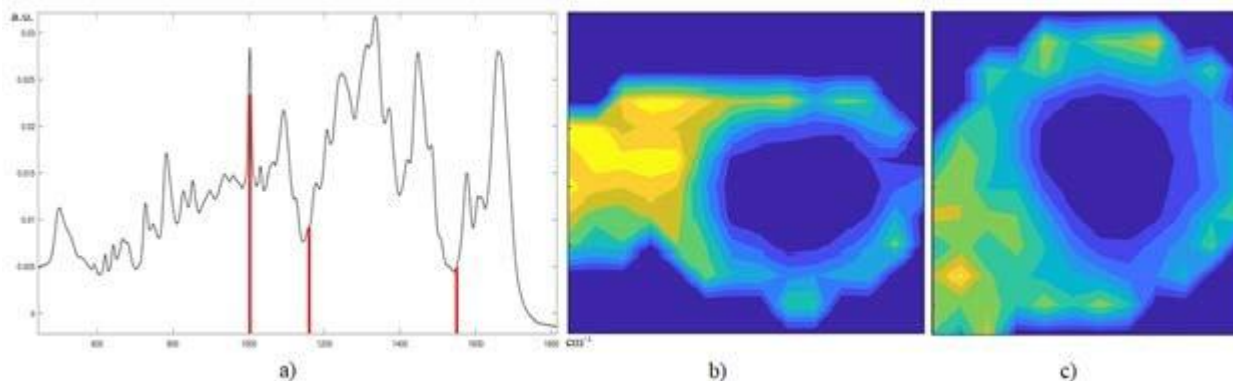


Рис. 18. а) піки, що відповідають хімічним сполукам мітохондрії б) сперматозоїд з чітко вираженою мітохондрією с)сперматозоїд з слабо вираженою або відсутньою мітохондрією.

Відсутність мітохондрії, отримана на Рис.18 с, означає нездатність сперматозоїда до руху, так як саме мітохондрія генерує енергію для руху хвоста. Нерухомі сперматозоїди та такі що не можуть рухатись в прямому напрямку вважаються нежиттєздатними та відбраковуються перед штучним заплідненням різними методами (наприклад метод прямого спливання,

застосований в даній роботі). Наявність таких сперматозоїдів в нашій вибірці означає, що використаний метод очистки еякуляту ефективний не на 100%.

Ядро сперматозоїда визначалось за сукупністю інтенсивностей піків, що відповідають хімічному складу нуклеїнових кислот, а саме аденіну – 783 cm^{-1} , 1371 cm^{-1} , 1481 cm^{-1} (Рис.19 а). Так як положення ядра нелокалізоване в голові сперматозоїда, використовувались лише аналітичні методи знаходження.

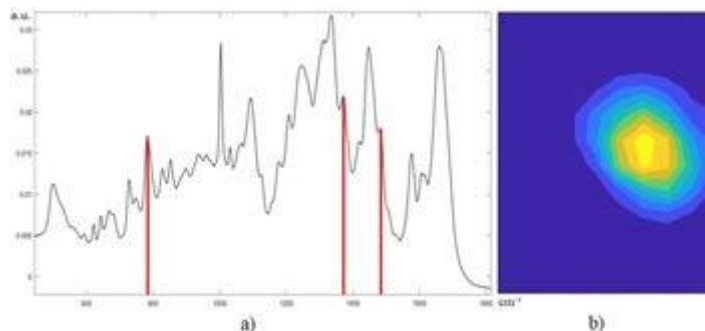
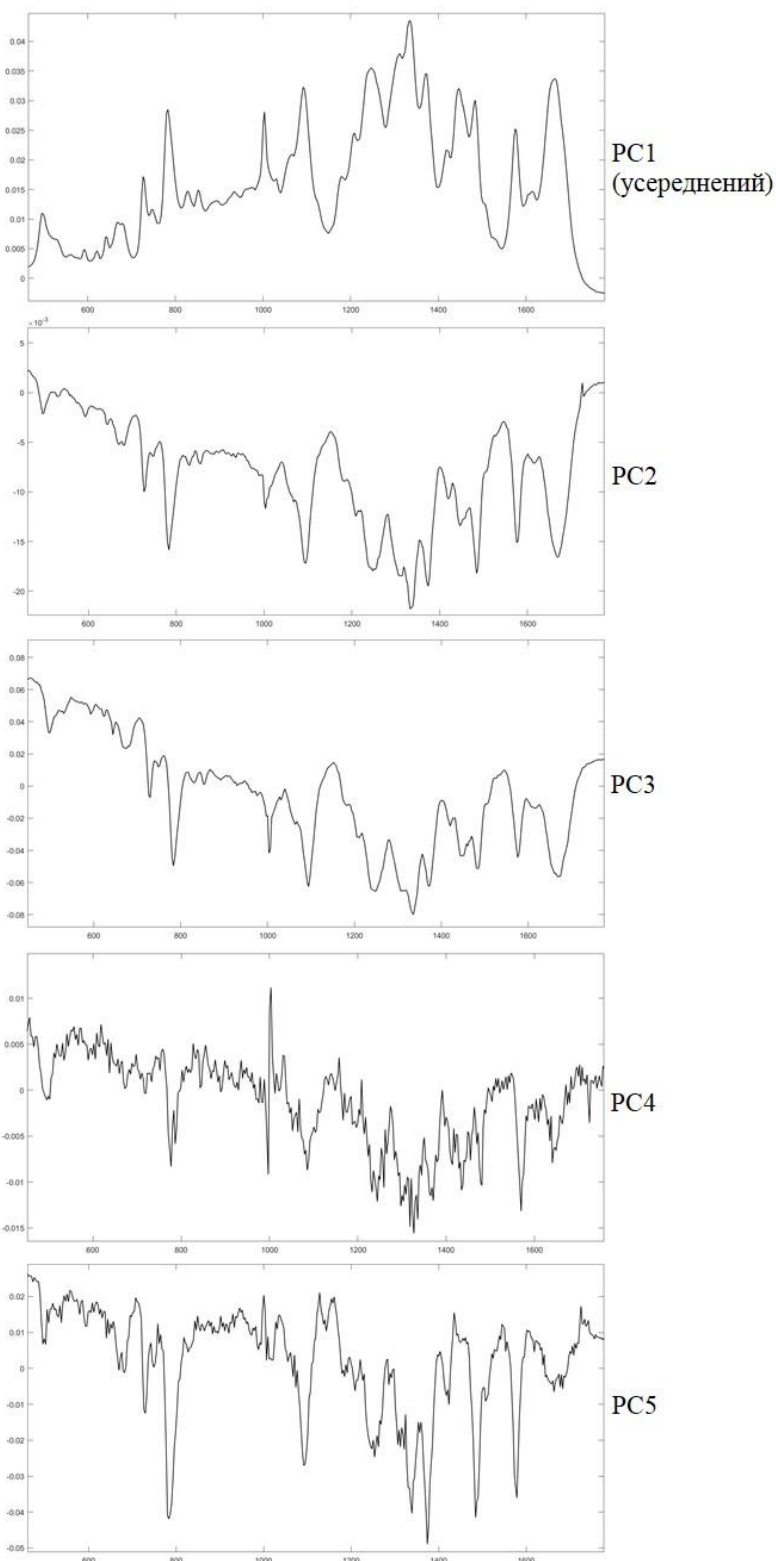


Рис. 19. а) піки, що відповідають хімічному складу ДНК б) сперматозоїд з компактною формою ядра с)сперматозоїд з розмазаню формою ядра.



Як видно з Рис. 19 ядро може бути як чітко локалізоване з великою концентрацією ДНК (b), так і не локалізоване, мати велику площу і рівномірно розподілену концентрацію ДНК по ній (c). Другий випадок також можливий за більшої кількості генетичного матеріалу, що знаходиться в ядрі (інша статеві хромосома або полісомія).

Для дослідження статистики за хромосомним складом було відскановано 106 сперматозоїдів і в кожному визначено ядро. Спектральна інтенсивність в точках ядра просумувувалась. На отриманій матриці спектрів повної інтенсивності ядра застосовувався метод головних компонент для більш поглибленого аналізу.

Було виявлено розділення на 2 групи за четвертою компонентою (PC4), зображеною на Рис. 20. Точки, що лежать далеко від

центрів скупчення – претенденти на наявність хромосомних аберацій (Рис.21). Також була побудована гістограма за значеннями інтенсивностей піків, що відповідають ДНК кожного сперматозоїда (Рис. 22). Отримана залежність кількості сперматозоїдів з визначеним рівнем генетичного матеріалу добре апроксимується функцією Гауса, що відповідає теоретичним припущенням. Точки, що знаходяться на хвостах Гауса в області більше двох нормальних відхилень також є претендентами на наявність хромосомних аберацій. Лівий хвіст відповідає меншому сигналу від ДНК на комбінаційних спектрах, а отже може містити значення, що відповідають сперматозоїдам з недостатньою кількістю хромосом в ядрі. На правому хвості маємо точки з коефіцієнтами, що відповідають зavelикому вмісту генетичного матеріалу в ядрі сперматозоїда. В таких випадках це можуть бути подвоєння чи потроєння хромосом.

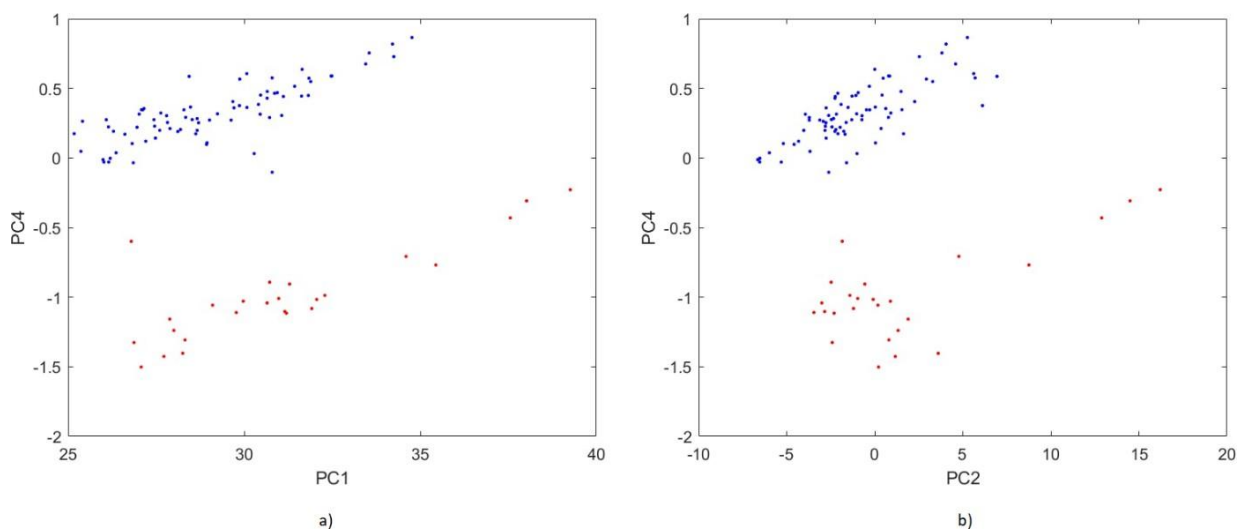


Рис. 21. Кластеризація даних за головними компонентами а) за першою і четвертою б) за другою і четвертою.

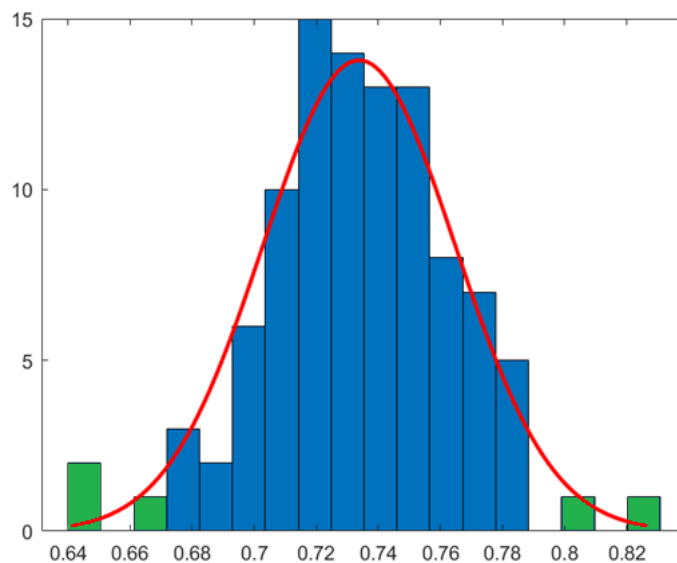


Рис. 22. Розподіл кількості сперматозоїдів за визначеним коефіцієнтом вмісту генетичного матеріалу.

Також були побудовані порівняльні візуалізації функціональних частин сперматозоїда та співвіднесені з їх реальними фотографіями (Рис.23, 24). Це означає, що раманівська спектроскопія дозволяє бачити об'єкти більш деталізовано, що надає можливості для аналізу сперми в лабораторіях точніше та легше при використанні даної техніки в режимі реального часу.

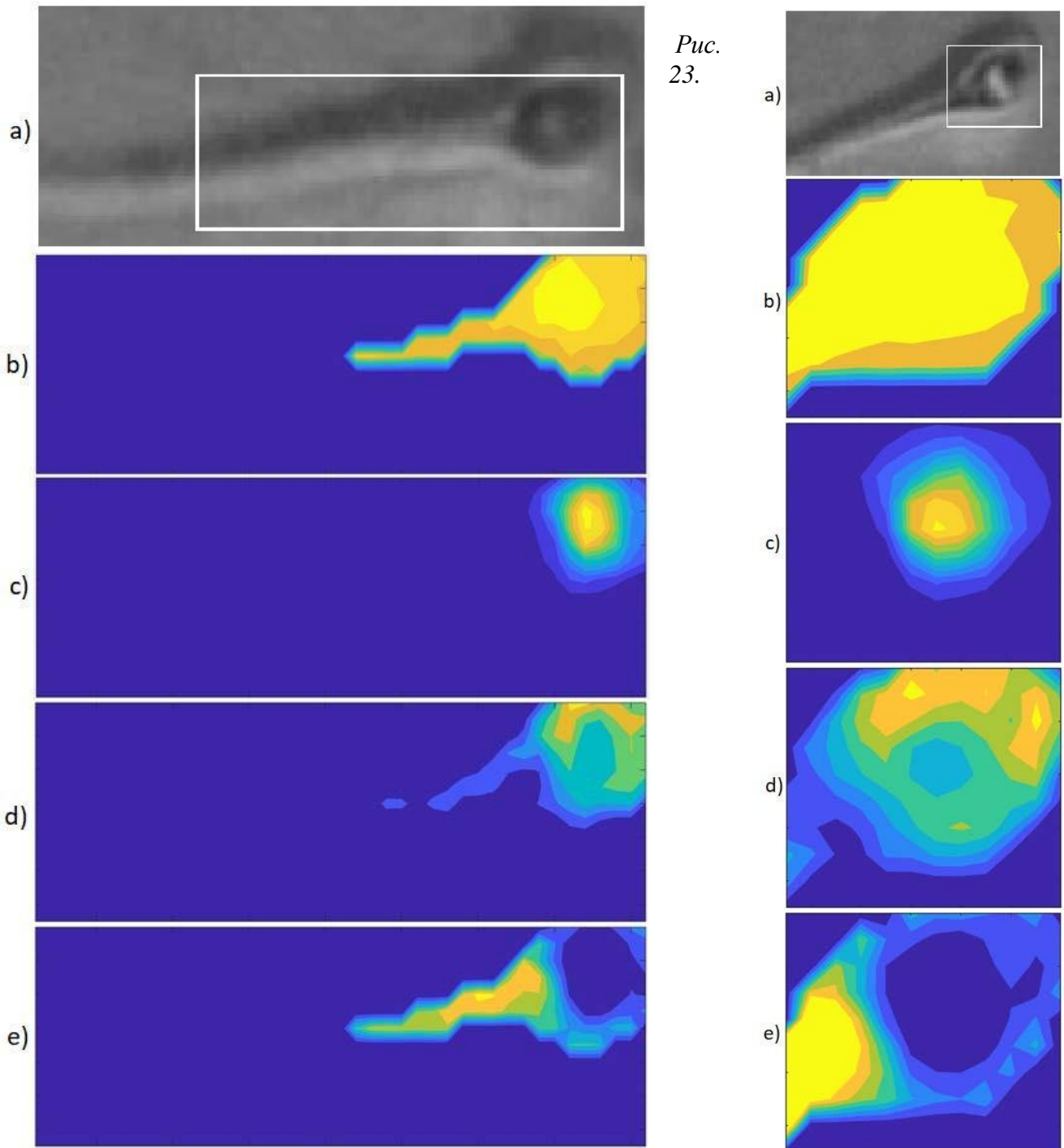


Рис. 23.

Порівняльна характеристика сперматозоїда за його функціональними частинами: а) реальний вигляд сперматозоїда з відзначеною на ньому областю сканування б) розподіл за наявністю С-Н коливань с) ядро d) акросома e) мітохондрія

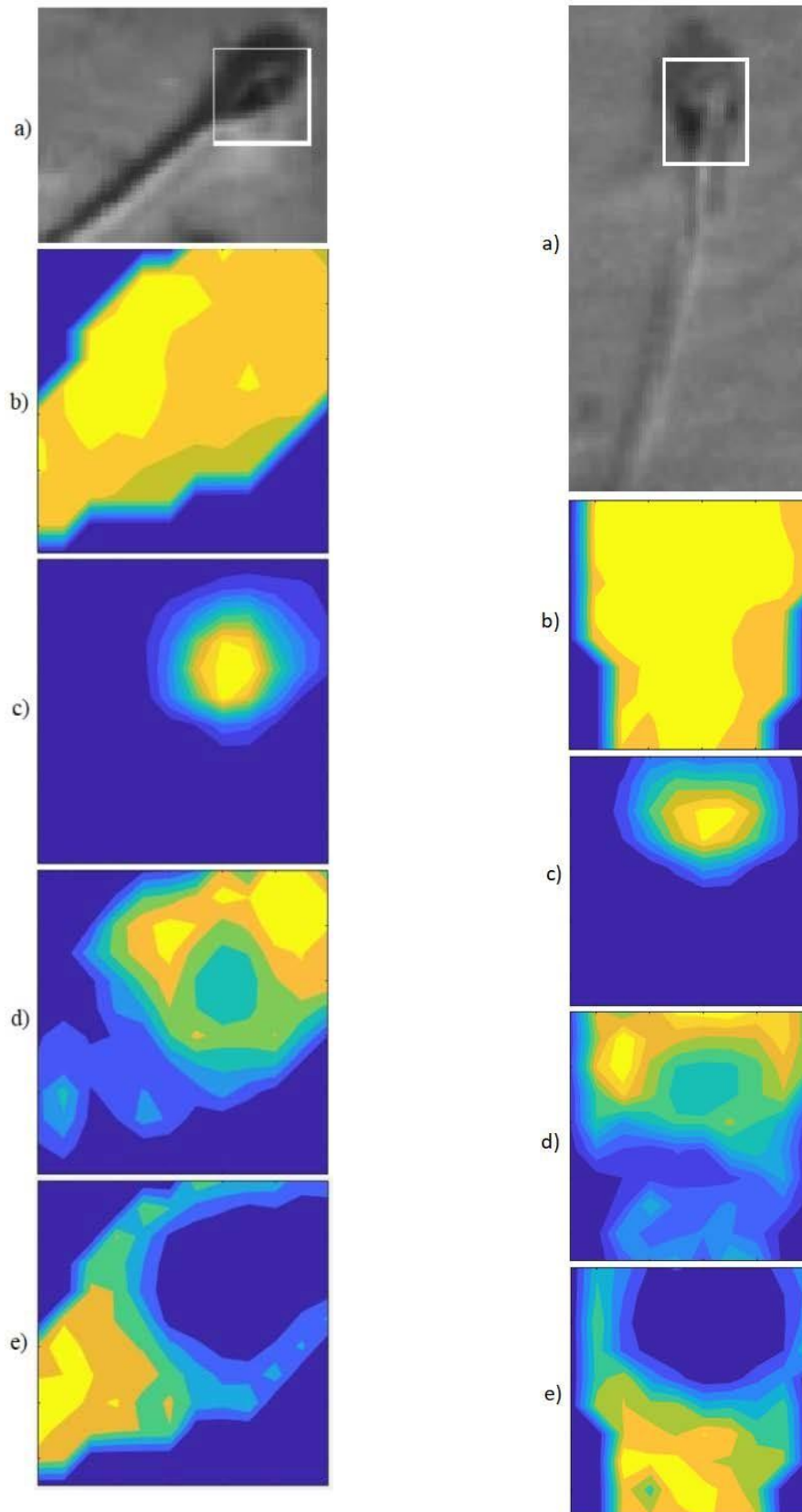


Рис. 24. Порівняльна характеристика сперматозоїда за його функціональними частинами: а) реальний вигляд сперматозоїда з відзначеною на ньому областю сканування б) розподіл за наявністю С-Н коливань в) ядро г) акросома е) мітохондрія

4. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ВИСНОВКИ

1. Вперше запропоновано методику визначення морфологічних аномалій статевих клітин людини із застосуванням Раманівської мікроскопії. В роботі, поєднуючи хімічний аналіз за спектрами Раманівського розсіяння світла з просторовим скануванням в межах досліджуваного зразка, отримано карти морфологічного розподілу функціональних частин окремих сперматозоїдів.
2. Визначено критерії та запропоновано алгоритм обробки спектральних даних для ідентифікації та розміщення акросоми, мітохондрії та ядра статевої клітини. Розроблено програмний код, що може бути використаний в автоматизованих системах аналізу для лабораторій репродуктивної медицини та сільського господарства.
3. Використання методів попередньої обробки експериментальних спектрів дозволяє покращити якість аналізу досліджуваних об'єктів. Зокрема, застосування методу головних компонент для масиву корельованих даних дає можливість збільшити співвідношення сигнал-шум. Процедура мультиплікативного нормування спектрів та корекції флуоресцентного фону дозволяє покращити точність просторово розділеного хімічного аналізу.
4. Аналіз спектрів Раманівського розсіяння ядер сперматозоїдів аналітичними методами, такими як метод головних компонент надає якісну інформацію щодо кількості генетичного матеріалу кожної статевої клітини. Метод кластеризації застосований на отриманих даних дозволяє визначити критерії розділення клітин на групи за хромосомним складом, що включає в себе клітини з нормальним каріотипом, моносомією та полісомією. І може використовуватись для класифікації сперматозоїдів за хромосомними абераціями в лабораторіях репродуктивної медицини.

ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ

- [1] Применение УФ-, ИК-, ЯМР и МАСС спектроскопии в органической химии, 2-е издание/ Л. Л. Казицына, Н. Б. Куплетская//1979 – Р. 66
- [2] Handbook of vibrational spectroscopy, Theory and instrumentation/ J. M. Chalmers, P. R. Griffiths// 2002 – Vol.1 P. 84-100
- [3] Метод микроспектроскопии комбинационного рассеяния для исследования свойств миелина нервных волокон/Кутузов Н. П.//2016
- [4] Limitations and Advantages of Raman Spectroscopy for the Determination of Oxidation Stresses/P. Y. Hou, J. Ager, J. Mougín, A. Galerie //2011
- [5] Mitochondrial functionality modifies human sperm acrosin activity, acrosome reaction capability and chromatin integrity/ G. Zhang, W. Yang, P. Zou, F. Jiang, Y. Zeng, Q. Chen, L. Sun, H. Yang, N. Zhou, X. Wang, J. Liu, J. Cao, Z. Zhou, L. Ao//2019
- [6] The biological and functional significance of the sperm acrosome and acrosomal enzymes in mammalian fertilization/D. R. Tulsiani, A. Abou-Haila, C. R. Loeser, B. M. Pereira//1998
- [7] A new computerized method of reading sperm morphology (strict criteria) is as efficient as technician reading/ T. F. Kruger, T. C. DuToit, D. R. Franken, A. A. Acosta, S. C. Oehninger, R. Menkveld, C. J. Lombard //1993
- [8] The nature of human sperm head vacuoles: a systematic literature review/ F. Boitrelle, B. Guthauser, L. Alter, M. Bailly, R. Wainer, F. Vialard, M. Albert, J. Selva //2013
- [9] Overview of Sex Chromosome Anomalies/ N. N. Powell-Hamilton//2020
- [10] H. Ye, G. Huang, Y. Gao, D. Y. Liu/ Relationship between human sperm-hyaluronan binding assay and fertilization rate in conventional in vitro fertilization// 04 April 2006
- [11] Flow Cytometry: An Overview/ K. M. McKinnon// 2018
- [12] Non-invasive sex assessment in bovine semen by Raman spectroscopy/ A. C. De Luca, S. Managó, M. A. Ferrara, I. Rendina, L. Sirleto, R. Puglisi, D. Balduzzi, A. Galli, P. Ferraro, G. Coppola// 2014
- [13] Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)/ C. O'Connor//2008
- [14] Sperm preparation: state-of-the-art—physiological aspects and application of advanced sperm preparation methods/ R. Henkel// 2011 Dec 5
- [15] Effects of advanced selection methods on sperm quality and ART outcome: a systematic review/ T. M. Said, J. A. Land// 2011
- [16] Sperm processing for advanced reproductive technologies: Where are we today?/ K. L. Rappa, H. F. Rodriguez, G. C. Hakkarainen, R. M. Anchan, G. L. Mutter, W. Asgha// 2016
- [17] Review on Sperm Sorting Technologies and Sperm Properties toward New Separation Methods via the Interface of Biochemistry and Material Science/ R. D. Katigbak, G. M. Turchini, S. P. de Graaf, L. Kong, L. F. Dumée// 2019

- [18] Raman micro-spectroscopy analysis of different sperm regions: a species comparison/ S. Amaral, R. Da Costa, F. Wübbeling, K. Redmann, S. Schlatt// 2017
- [19] Метод Главных Компонент (PCA)/ А. Померанцев// 2008
- [20] Extended multiplicative signal correction in vibrational spectroscopy, a tutorial/ N. Kristian Afseth, A. Köhler// 2012
- [21] Raman Spectroscopy of Biological Tissues/ A. C. S. Talari , Z. Movasaghi , S. Rehman, I. ur Rehman// 2014
- [22] Spectra preprocessing for hyperspectral Raman imaging analysis of biological objects/ A. Kutsyk, O. Stanovyi, D. Krasnienkov, A. Reynt, T. Papurina// 2018