www.dergipark.gov.tr
ISSN:2148-3736
El-Cezerî Fen ve Mühendislik Dergisi
Cilt: 5, No: 3, 2018 (828-835)

El-Cezerî Journal of Science and Engineering
Vol: 5, No: 3, 2018 (828-835)
DOI : 10.31202/ecjse.426584

ECJSE

Makale / Research Paper

Aynalı Sazan (*Cyprinus carpio*) Balığında İmaj J-Fiji ile Sperm Hücresi Hareketlilik ve Hız Analizi

Mustafa Erkan ÖZGÜR[1*], Fatih OKUMUŞ[2], Muhammed Fatih TALU[3], Burhan ATEŞ[4], Adnan Fatih KOCAMAZ[3], Selahattin GÜRÇAY[5], Selim ERDOĞAN[6]

[1*]İnönü Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Balık Yetiştiriciliği Bölümü, 44280, Malatya, Türkiye
[2]İnönü Üniversitesi, Doğanşehir Vahap Küçük MYO, Bilgisayar Teknolojileri Bölümü, Malatya, Türkiye
[3]İnönü Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Bilgisayar Mühendisliği Bölümü, Malatya, Türkiye
[4]İnönü Üniversitesi, Fen EdebiyatFakültesi, Kimya Bölümü, Malatya, Türkiye
[5]Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Elazığ Su Ürünleri Araştırma Enstitüsü, Elazığ, Türkiye
[6]İnönü Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Temel Eczacılık Bilimleri Bölümü, Malatya, Türkiye
mustafa.ozgur@inonu.edu.tr

Received/Geliş: 23.05.2018 **Revised/Düzeltme:** 29.06.2018 **Accepted/Kabul:** 29.07.2018

Öz: Bu çalışma İmage J-Fiji programıyla sperm hücrelerine ait hareket değerlendirme yöntemi, bu yöntemin uygulanabilirliği, kolaylığı ve/veya zorluğunu araştırılması amacıyla yapılmıştır. Elde edilen parametreler, uluslararası yayınlarda sunulmuş benzer bilgisayar sistemleri ile elde edilmiş verilerle karşılaştırmaları yapılmıştır. Çalışmada aynalı sazan (Cyprinus carpio) türü balıklara ait sperm örnekleri incelenmiştir. İncelenen sperm hücrelerine ait hareketlilik parametreleri sırasıyla VSL: 74.05 µm/sn, VCL:115.18 µm/sn, VAP:63.85µm/sn, BCF: 10.75 Hz ve ALH: 19.28µm olarak hesaplanmıştır. Sonuç olarak, İmaj J-Fiji programı ile balıklarda sperm hücresi yakalama, işleme ve değerlendirme işlemlerinin kolay, uygulanabilir olduğu ve balık üretim merkezlerinde erkek damızlık balıkların sperm kalitesinin belirlenmesinde pratik ve hızlı bir yöntem sunduğu söylenebilir.

Anahtar kelimeler: İmaj J-Fiji, sperm hücresi hareketi ve hızı, aynalı sazan.

The Analysis of Sperm Cell Motility and Velocity with Image J-Fiji in Common carp (*Cyprinus carpio*)

Abstract: In this study, we were especially aimed to determine the applicability, ease and / or difficulty about Image J-Fiji program and its process which are stil widely used to evaluation of sperm cell motility. The obtained parameters were compared with the results which presented with similar computer systems. Therefore, in this study, the sperm samples of Common carp (*Cyprinus carpio*) species have examined and parameters of sperm cell motility were calculated such as VSL: 74.05 µm/s, VCL:115.18µm/s, VAP:63.85 µm/s, BCF: 10.75 Hzand ALH: 19.28µm. Finally, it can be said that the Image J-Fiji program provides a practical and quick method for the detection and processing of sperm cells in fishes, and that it is easy and feasible to determine the sperm quality of male broodstocks in fish hatchery centers.

Keywords: Image J-Fiji, sperm cell motility and velocity, Cyprinus carpio.

1. Giriş

Bilgisayar destekli sperm analizi (İngilizce kısalması: CASA) birkaç ileri görüşlü araştırmacı tarafından "Ya olursa" düşüncesinden başlayarak son 40 yılda gelişen bir teknolojidir. Sperm hücresine ait görüntü ve kayıt alımı, ilgili bilgisayar teknolojileri ve özellikle yazılım kısmı önemli

Bu makaleye atıf yapmak için
*Özgür, M.E., Okumuş, F., Talu, M.F., Ateş, B., Kocamaz, A.F., Gürçay, S., Erdoğan, S., "**Aynalı Sazan (Cyprinus carpio) Balığında İmaj J-Fiji ile Sperm Hücresi Hareketlilik ve Hız Analizi**"* El-Cezerî Fen ve Mühendislik Dergisi 2018, 5(3); 828-835.

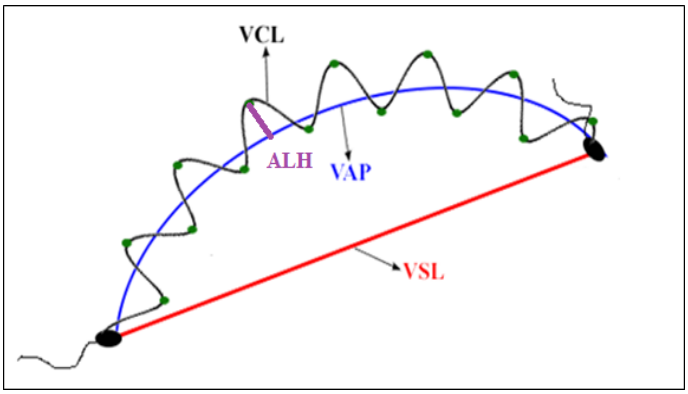
How to cite this article
Özgür, M.E., Okumuş, F., Talu, M.F., Ateş, B., Kocamaz, A.F., Gürçay, S., Erdoğan, S., "The Analysis of Sperm Cell Motility and Velocity with Image J-Fiji in Common carp (Cyprinus carpio)" El-Cezerî Journal of Science and Engineering, 2018, 5(3); 828-835.

bir ihtiyaç haline gelmiştir. Böylece çalışmalar daha da bilimsel bir yüz kazanmış, sperm hücresine ait hızlarının hesaplanması sağlanmış ve eskiden yapıldığı gibi gözlemcinin "öznel tahminleri" ortadan kalkmıştır. Tüm bunların yanında ana temel kazanım ise "zaman" olup, çok daha kısa sürede çok sayıda örnek incelenmesi sağlanmıştır [1].

Sperma kalitesini tespit etmek, her zaman pratik metotlara ihtiyaç duymaktadır. Aktif olan sperm hücresinin hareket hızlarının yüzdesi, hareketlilik süresi, sperm konsantrasyonu, spermatokrit ve seminal plazma kompozisyonu gibi birçok parametre sperm kalitesini ölçmede kullanılmaktadır [2, 3].

Özellikle balık üretim ve yetiştiriciliğinde, yaşama kabiliyeti yüksek, hastalıklara dirençli, iyi beslenebilen ve hızlı büyüyebilen vb. özelliklere sahip yavruların elde edilmesi ancak yüksek gamet kalitesine (sperm ve yumurta) sahip damızlıkların kullanılması ile mümkündür [4, 5]. Bununla birlikte, ticari balık kuluçkahanelerinde, sperm hem nitelik hem de nicelik bakımından çoğunlukla yetersiz ve genellikle suni dölleme sırasında yeterli dölleme kabiliyetine sahip olmayabilmektedir. Bu özellikle, Afrikan yayın balığında (*Clarias gariepinus*) yeterli sperm alınamayışı, Kalkan balığı (*Psetta maxima*) ve Sarı kuyruk pisi balığı (*Pleuronectes ferrugineus*) türlerinde yeterli miktarda sperm olmayışı (1 ml'den az/1 balık) [6, 7] gibi durumlarda sperm kalitesinin belirlenmesi ve analizi oldukça önem arz etmektedir.

Yine dış döllenme stratejine sahip çoğu teleost balıklarında, sperm hücresi hareketlilik süresi kısa olup (özellikle alabalıklarda 20-25 saniye; aynalı sazanda 1-2 dakika), aktivasyon sonrası hızlı bir şekilde düşme eğilimindedir [8]. Dolayısıyla çok kısa süre canlılık özelliklerine sahip balık sperm hücresinin kalite parametrelerinin tespitinde hızlı, pratik ve tekrarlanabilir özelliklere sahip metotlar geliştirilmesi bir zorunluluk halini almıştır. Bu nedenle memeliler için çıkarılmış olan bilgisayar destekli sperm analiz sistemleri balık için de kullanılma imkânları araştırılmaya başlanmıştır.
Bilgisayar destekli sperm analiz sistemleri, birçok canlı türünün sperm hücrelerinin hareketlerini pratik ve doğru analizi için çok popüler bir konumda olup, geçmişte kullanılan klasik metotlarla analizcinin bireysel duygularına dayalı tahmini metotların yerini almıştır. Özellikle balıklarda olduğu gibi sperm hücresi hareketlilik sürelerinin düşük olduğu canlı türlerinde sperm hücresi hareketlerinin tespiti için oldukça önemli sistemler haline gelmiştir. Bilgisayar destekli sperm analiz sistemleri ile balık sperm hücrelerinin hız ve hareketlilik parametrelerinden VSL(Straight line velocity): Düz Çizgi Hızı (µm/sn), VCL (Curvi linear velocity): Eğri Çizgi Hızı (µm/sn), VAP(Angular part velocity): Ortalama Rota Hızı (µm/sn), BCF (Beat cross frequency): Kuyruk vuruş frekansı (Hz), ALH (Amplitude of lateral head displacement): Sperm başının ortalama yolda ilerlerken laterale doğru saptığı uzaklık (µm) ve konsantrasyon gibi bir çok kalite parametrelerini çok kısa sürede tespit edilebilmektedir [9] (Şekil 1).



Şekil 1. Bilgisayar destekli sperm analiz sistemleriyle ölçülen bazı hareketlilik değişkenleri

2. Materyal ve Metot

2.1. Sperm Örneklerinin Temini

Çalışma için kullanılacak *Cyprinus carpio* türü balıklar üreme sezonu (2017 Mayıs), Karakaya Baraj Gölü'nden yakalandı. 45-50 mm göze açıklığına sahip germe ağlarıyla (Ser-topla süresi: 2 saat) balıklar yakalanıp, erkek bireylerden sperm örnekleri alınarak, balıklar tekrar yaşam yerlerine bırakıldı. Yakalama esnasından hiçbir balık ölmemiştir. Bu şekilde yakalanan 10 erkek bireyden sperm örnekleri alındı. Örnekler balığın karnının hafif sıvazlanması ile ependorf tüplerine alındı ve laboratuvara götürülene kadar buz destekli ortamda nakil edildi. 1 saat içinde örnekler laboratuvarda incelendi Sperm örnekleri mikroskop altında incelenme aşamasında öncelikle hareket engelleyici (immotil) solüsyonuna (IMS) (200 mMKCl, 30 mM Tris-HCl, pH 8.0 [3]) 1:100 (Sperm:IMS) oranında seyreltildi. Daha sonra mikroskop altında incelenirken aktivasyon solüsyonu (AS) ile (45 mM NaCl, 5 mM KCl, 30 mM Tris-HCl, pH8.0 [3]) 1:20 (Sperm:AS) oranında aktive edilerek incelendi. Sperm örneklerinin seyreltme oranları 2-adım prosedürüne göre yapıldı [2].

2.2. Bilgisayarlı Sperm Analizi ve Görüntülerin işlenmesi

Sperm örnekleri incelenmesi için, Olympus BX 53 trinoküler faz kontrast mikroskop, 20x1,25 büyütmeli objektif kullanılmıştır. Sperme ait kamera kayıtları yine sisteme ait mikroskoba bağlı Sony CCD kamera kullanılmıştır. Sperm örneklerinin işlenmesi Pavlov [10]'un tanımladığı yönteme göre yapıldı ve Image J-Fiji programı kullanıldı. Buna göre, sıkıştırılmamış AVI formatlı videolar, 8 bit>Threshold (Otsu) >MTrack2 plugin kullanılarak hücreler yakalandı ve hareketleri takip edildi. Elde edilen veriler, Wilson-Leedy ve Ingerman [11] tarafından geliştirilen açık kaynak kodlarından (CASA.java plugin) faydalanılarak algoritmaları oluşturulan uygulama programında (CASA.EXE) sperm hücrelerinin hareketlilik parametreleri veya hızları sırasıyla, VSL (µm/s), VCL (µm/s) ve VAP (µm/s) değerleri hesaplandı. Uygulama programının (CASA.EXE) yapımında OpenCV (Open Source Computer Vision-Açık Kaynaklı Bilgisayarlı Görü) ve kütüphanesinden faydalanılarak ilk defa bu çalışmada yapıldı (Şekil 2). Yine her parametrenin hesaplanmasında aşağıdaki formüllerden yararlanıldı [12, 13]. Buna göre;

VSL hesaplanması: Düz Çizgi Hızı (µm/sn). Her bir sperm hücresi için başlangıçtaki görüntü karesi ile bitiş görüntü karesinde bulunduğu noktaların arasındaki düz çizgi uzaklığının zamana bölünmesinden elde edilir. Tüm hareketli hücreler için VSL hesaplaması yapıldıktan sonra toplanır ve hücre sayısına bölünerek hesaplandı.

$$VSL = \frac{\sum_{i=0}^{n}\left(\frac{\sqrt{(x_k - x_0)^2 + (y_k - y_0)^2}}{p * \Delta t}\right)}{n} \quad (1)$$

VCL hesaplanması: Eğri Çizgi Hızı (µm/sn). Sperm hücresi başının videodaki başlangıç noktasından bitiş noktasına kadar geçtiği tüm noktaların birleşmesi ile oluşan uzaklığın zamana bölümünden elde edilen değerdir. Her sperm hücresi için VCL hesaplaması yapıldıktan sonra ortalama bir VCL değeri elde edildi.

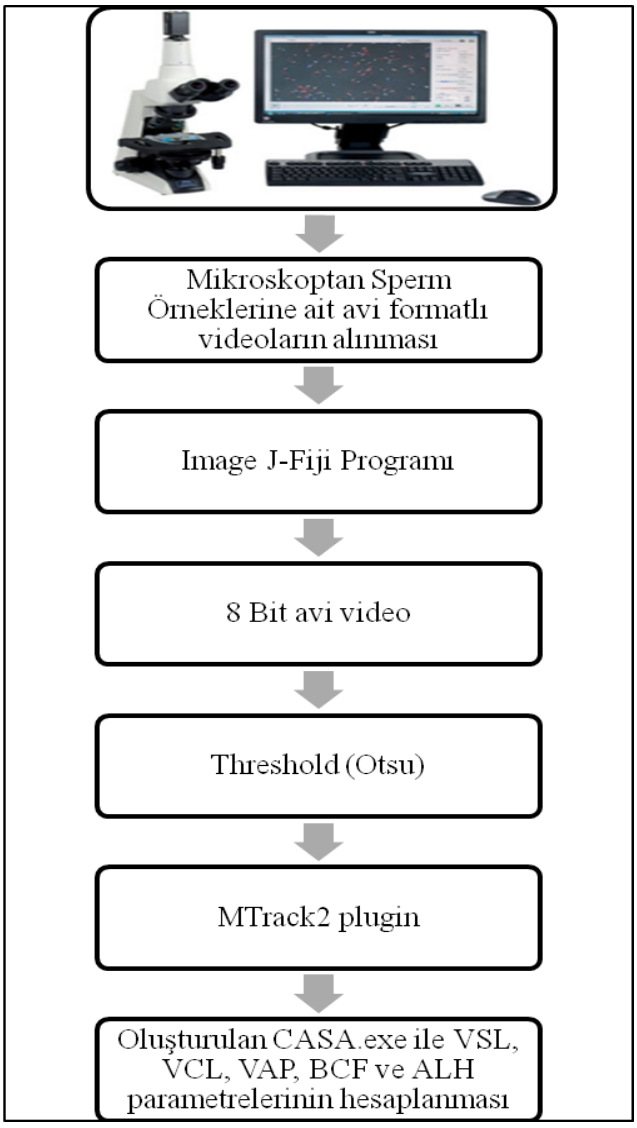
$$VCL = \frac{\sum_{j=0}^{n}\left(\frac{\sum_{i=0}^{k-1}\left(\sqrt{(x_{i+1} - x_i)^2 + (y_{i+1} - y_i)^2}\right)}{p * \Delta t}\right)}{n} \quad (2)$$

VAP hesaplaması: Ortalama yol hızı (µm/sn). Eğrisel yolun düzleştirilmesi ile elde edilen yolun zamana bölünmesi ile elde edilir. Her bir noktada VSL ve VCL değerinin ortalaması alınarak hesaplanır. Bu parametre araştırmacıya hücrelerin hedefine hangi meyille gittiğinin bilgisini vermektedir. VAP değeri her bir hücre için hesaplandıktan sonra ortalama bir değer hesaplandı.

$$VAP = \frac{\sum_{j=0}^{n}\left(\frac{\sum_{i=0}^{k-1}\left(\sqrt{(\overline{x_{i+1}} - \overline{x_i})^2 + (\overline{y_{i+1}} - \overline{y_i})^2}\right)}{p * \Delta t}\right)}{n} \quad (3)$$

ALH Hesaplama: Sperm başının ortalama yolda ilerlerken laterale doğru saptığı uzaklığı (µm) aşağıdaki formül ile hesaplandı

$$ALH = \frac{\sum_{i=0}^{n}(ALH_i)}{n} \quad (4)$$



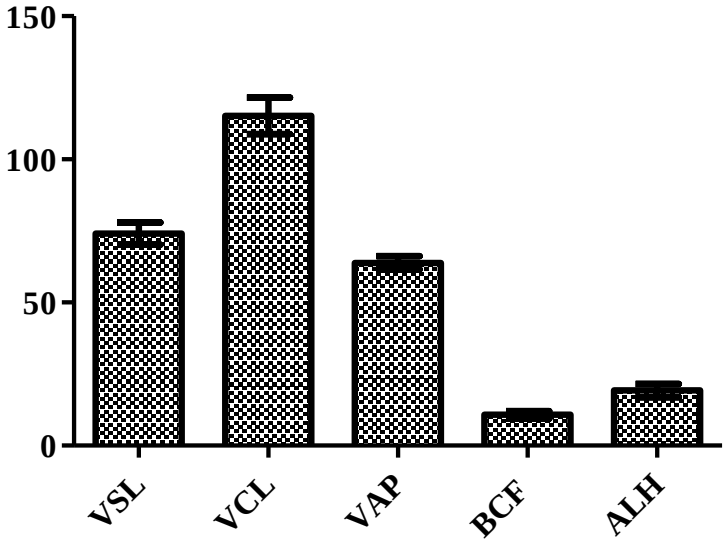
Şekil 2. Bilgisayar analizinde sperm hücresi yakalama, izleme ve hareketlilik parametrelerini hesaplama düzeni

BCF Hesaplama: Kuyruk vurma veya kesişme frekansı (Hz). Sperm hücresinin eğrisel çizgi rotasının ortalama rotasıyla kesişme sıklığı ortalamasıdır. VAP ve VCL çizgilerinin birbirini kestiği noktaların sayısı alınarak elde edildi.

İstatistikî değerlendirmede SPSS 17 programından faydalanıldı. Her bir bireye ait verileri Test of Homogeneity of Variances ile homojenliği test edildi. Verilerin minimum ve maksimum (Min.-Max.) değerleri, aritmetik ortalaması ve standart hatası (X±S.Hata) hesaplandı. Grafikler GraphPad Prism programında oluşturuldu.

3. Bulgular

Bu çalışmada aynalı sazan (*Cyprinus carpio*) türü balıklara ait sperm örnekleri incelenmiştir. İncelenen sperm örneklerine ait sırasıyla VSL: Düz Çizgi Hızı (µm/s), VCL: Eğri Çizgi Hızı (µm/s), VAP: Ortalama Rota Hızı (µm/s), BCF: Çapraz Kesişme Frekansı (kesişme/saniye) ve ALH: Sperm başının ortalama yolda ilerlerken laterale doğru saptığı uzaklık (µm) gibi hareketlilik ve hız parametreleri hesaplanmıştır. Bilgisayar destekli görüntü işleme yöntemi ile aynalı sazan (*Cyprinus carpio*) sperm örneklerinin hesaplanan hareketlilik değerleri; ortalama VSL değeri 74.05±3.85µm/sn (Min.-Max.: 58.06 - 83.12), ortalama VCL değeri 115.18±6.38µm/sn (Min.-Max.:102.86 - 133.86), ortalama VAP değeri 63.85±2.29µm/sn (Min.-Max.: 56.29 - 71.76), ortalama BCF değeri 10.75±1.37Hz (Min.-Max.: 5.83–15.72) ve ortalama ALH değeri 19.28±2.28 (Min.-Max.: 13.09 -28.95) olarak hesaplanmıştır (Şekil 3).



Şekil 3. Aynalı sazan sperm hücresine ait hareketlilik ve hız parametreleri

4. Tartışma ve Sonuç

Kemikli balıklarda sperm hücresi aktivasyonun hemen sonrası genel olarak düz veya hafifçe eğri bir yörünge boyunca hareket eder. Sperm hücresi hareket yörüngeleri, aktivasyon periyodu sonuna doğru, kirleticilere maruz kaldıkları esnada veya uygun olmayan seyreltici içinde eğriliği artabilir ve iç içe daireler şekline dönüşebilir. Döllenme hem hareketli sperm hücresi sayısına hem de onların hızlarına bağlı olabilir [14]. Özellikle yine kemikli (Teleost) balıklarda sperm hücresi karakteristiği, testislerde hareketsiz oluşu, hareketin ancak vücut dışına çıktığı ve su ile temas ettiği anda başlayışı, hareket süresinin 2 dk'dan daha az oluşu ve akrozom bulunmayışı ile memelilerden oldukça belirgin olarak ayrılmaktadır. Sperm kalitesinin değerlendirilmesinde iki en önemli parametre, aktif hareket hızları ve hareket süresidir. Balıklarda sperm hücresi yörüngesi genel

olarak memelilerden daha fazla eğriseldir ve balık sperm hücresi su içeren sıvı bir ortamda 3 boyutlu hareket edebilirler. Memelilerde sperm hücresine ait VSL (Düz çizgi hızı) döllemede en önemli gösterge olduğu ifade edilirken, balıklarda fertilizasyon veya yumurta açılım oranı ile sperm hareket hızları (VSL veya VCL) arasında kuvvetli pozitif bir ilişki olduğunu rapor edilmektedir [9]. Çalışmada ortalama VSL değeri 74.05 µm/sn olarak hesaplanmış, bu değerin bazı araştırıcıların [15] verilerinden küçük iken, diğer bazılarının [16-19] bulduğu değerlerden büyük olduğu tespit edilmiştir. Yine sperm örneklerinin ortalama VCL değerinin 115.18 µm/sn olarak hesaplanmış ve bu değerin Dietrich ve arkadaşları [19] ve Boryshpolets ve arkadaşlarının [13] verilerinden küçük, Chyb ve arkadaşlarının [16, 17] değerlerinden ise büyük olduğu gözlenmiştir. Ortalama VAP değerinin 63.85 µm/sn olduğu ve bu değerin diğer araştırıcıların [15-19] verilerinden küçük olduğu tespit edilmiştir (Tablo 1).

Tablo 1. Aynalı sazan sperm hücresinin hareket hızlarına ait literatür karşılaştırması

Parametreler	Bu çalışma	Dietrich ve ark. [19]	Chyb ve ark. [16]	Chyb ve ark. [17]	Boryshpolets ve ark. [13]
			Ortalama değerler		
VSL (µm/s)	74.05	60-80	45-50	45-50	79-109
VCL (µm/s)	115.18	150-155	85-90	80-85	123-151
VAP (µm/s)	63.85	-	65-70	65-70	103-141

İncelenen VSL, VCL ve VAP değerlerinin farklılıklarının öncelikle araştırmacılarca kullanılan farklı bilgisayar destekli sperm analizör sistemlerinden kaynaklanabileceği [15] ve bunun yanında balıkların beslenme rejimlerinin farklılıklarından [20], anaç balık stres faktörlerinden [21], damızlık yaşı ve üreme sezonundan [22] kaynaklanabileceği söylenebilir.

Bu çalışmanın da temel amaçlarından birinin balıklarda sperm hücresi hareketliliğinin bilgisayar destekli yöntem ile değerlendirilmesidir. Yine piyasada ülkemize getirilerek satılan bilgisayar destekli sperm analiz sistemleri ve bu çalışmada tartışılan yazarların kullandıkları otomatik sperm analiz sistemleri (Hobson Sperm Tracker (HobsonVisionLtd, Baslow, UK) ve CRISMAS CASA) oldukça pahalı sistemlerdir. Bu çalışma ile hücrelerin mikroskop altında yakalanması, görüntülerinin işlenmesi ve videolarının oluşturulması için ücretsiz herkesin kullanabileceği Image J-Fiji programı kullanılabilirliği, yöntemin kolaylığı, uygulanabilirliği, ülkemiz araştırmacılarının bu yöntemin detaylarına ulaşabilmelerinin sağlanması amaçlanmıştır. Böylece balıklardaki sperm hücresi yörüngesel hareketlerini belirleyebilen ve temel hızlarını ölçebilen geliştirilmiş yöntem uygulanmış, işgücü açısından oldukça rahat olduğu, bunun yanında mikroskobik hücrenin hareketlerinin ancak bu ve buna benzer yöntemlerle yapılabileceği tespit edilmiştir. Sonuç olarak açıklanan görüntü işleme yöntemi ile balıklarda bilgisayar destekli sperm analizi ve kalite parametrelerinin ortaya çıkarılması işlemlerini çok hızlı, pratik yapan, bununla birlikte doğru ve anlaşılabilir sonuçlar üreten bir yöntem olduğu tespit edilmiştir. Özellikle bu yöntem, balık üretim sektörü içinde verimli ve kaliteli yeni bireyler elde edilmesinde, kaliteli spermlerin toplanıp saklanabilmesini sağlayacak ve ilgili bilimsel çalışmaların daha reel sonuçlar ile yapılabilmesine imkân sağlayacak bir yöntem olduğu söylenebilir.

6. Teşekkür

İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koodinasyon Birimine "Balıklarda bilgisayar destekli gamet kalitesi belirlenmesi ve su altı biyomonitoring sistemlerin geliştirilmesi ön Ar-Ge araştırma projesi" isimli ve 2015/17 nolu projeye vermiş olduğu desteklerden dolayı sonsuz teşekkürlerimizi sunarız.

Kaynaklar

[1] Amann R. P., Waberski D., "Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments", Theriogenology, 2014, 81:5-17.

[2] Billard R., Cosson M. P., "Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish", J. Exp. Zool., 1992, 261:122-131.

[3] Poupard G. P., Paxion C., Cosson J., Jeulin C., Fierville F., Billard R., "Initiation of carp spermatozoa motility and early ATP reduction after milt contamination by urine", Aquaculture, 1998, 160:317-328.

[4] Kjørsvik E., Mangor-Jensen A., Holmefjord I., "Egg quality in fishes", Adv. Mar. Biol., 1990, 26:71-113.

[5] Hardy R. W., "Broodstock management and egg and larval quality", Aquaculture, 1996, 141:140-142.

[6] Suquet M., Omnes M. H., Normant Y., Fauvel C., "Influence of photoperiod, frequency of stripping and presence of females on sperm output in turbot, *Scophthalmus maximus* (L.)", Aquac. Res., 1992, 23:217-225.

[7] Clearwater S. J., Crim L. W., "Gonadotropin releasing hormone-analogue treatment increases sperm motility, seminal plasma pH and sperm production in yellowtail flounder Pleuronectes", Fish Physiol. Biochem., 1998, 19:349-357.

[8] Alavi S. M. H., Cosson J., "Sperm motility in fishes. I. Effects of temperature and pH: A review", Cell Biol. Int., 2005, 29:101-110.

[9] Kime D. E, Van Look K. J. W., McAllister B. G., Huyskens G., Rurangwa E., Ollevier F., "Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish", Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology, 2001, 130: 425-433.

[10] Pavlov D. A. "A method for the assessment of sperm quality in fish", Journal of Ichthyology, 2006, 46:391-398.

[11] Wilson-Leedy J., Ingerman R., "Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters", Theriogenology, 2007, 67(3):661-672.

[12] Cooper T. G., Noonan E., von Eckardstein S., Auger J., Baker H. W. G., Behre H. M., Haugen T. B., Kruger T., Wang C., Mbizvo M. T., Vogelsong K. M., "World Health Organization reference values for human semen characteristics", Hum. Reprod., Update, 2010, 16:231-45.

[13] Hidayatullah P., Awaludin I., Kusumo R. D., Nuriyadi M., "Automatic sperm motility measurement", International Conference on Information Technology Systems and Innovation, ICITSI 2015 - Proceedings.

[14] Rurangwa E., Kime D. E., Ollevier F., Nash J. P., "The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish", Aquaculture, 2004, 234:1-28.

[15] Boryshpolets S., Kowalski R. K., Dietrich G. J., Dzyuba B., Ciereszko A., "Different computer-assisted sperm analysis (CASA) systems highly influence sperm motility parameters", Theriogenology, 2013, 80:758-765.

[16] Chyb J., Kime D. E., Mikolajczyk T., Szczerbik P., Epler P., "The influence of zinc on sperm motility of common carp-a computer assisted studies", Arch. Rybactwa, 2000, 8:5-14.

[17] Chyb J., Kime D. E., Szczerbik P., Mikolajczyk T., Epler P., "Computer assisted analysis (CASA) of common carp *Cyprinus carpio* L. spermatozoa motility in the presence of cadmium", Arch. Polish Fish., 2001, 9:173-181.

[18] Dietrich G. J., Dietrich M., Kowalski R. K., Dobosz S., Karol H., Demianowicz W., Glogowski J., "Exposure of rainbow trout milt to mercury and cadmium alters sperm motility parameters and reproductive success", Aquat. Toxicol., 2010, 97:277-284.

[19] Dietrich M. A., Dietrich G. J., Hliwa P., Ciereszko A., "Carp transferrin can protect spermatozoa against toxic effects of cadmium ions", Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol., 2011, 153:422-429.
[20] Izquierdo M. S., Fernández-Palacios H., Tacon A. G. J., "Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish", Aquaculture, 2001, 197:25-42.
[21] Kime D. E., Nash J. P., "Gamete viability as an indicator of reproductive endocrine disruption in fish". Science of the Total Environment, 1999, 233: 123-129.
[22] Vuthiphandchai V., Zohar Y., "Age-related sperm quality of captive striped bass *Morone saxatilis",* J. World Aquac. Soc., 1999, 30:65-72.