

РЕЗУЛЬТАТЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОПТИМАЛЬНЫХ РЕФЕРЕНТНЫХ ЗНАЧЕНИЙ ПОДВИЖНОСТИ СПЕРМАТОЗОИДОВ ОСЕТРОВЫХ РЫБ ДЛЯ МЕТОДА КОМПЬЮТЕРНОГО АВТОМАТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА СПЕРМЫ (CASA)

К. Л. ШУМСКИЙ, Н. В. БАРУЛИН

УО «Белорусская государственная сельскохозяйственная академия»,
г. Горки, Республика Беларусь, 213407

(Поступила в редакцию 02.02.2022)

Современные методы компьютерной диагностики качества спермы с использованием высокоскоростной съемки и специализированного программного обеспечения позволяют осуществлять точное определение траектории перемещения и скорости спермиев.

Автоматический компьютерный анализ подвижности сперматозоидов (CASA) позволяет проводить точную оценку таких показателей подвижности, как криволинейная скорость, прямолинейная скорость, средняя скорость движения по траектории, линейность. Получаемые данные позволяют дать объективную оценку качеству спермы и преодолеть субъективность интерпретации, присущей стандартной спермограмме. Цель наших исследований заключалась в определении оптимальных референтных значений подвижности сперматозоидов для метода компьютерного автоматического анализа спермы (CASA), в племенной оценке самцов-производителей осетровых рыб в искусственном оплодотворении при содержании в установках замкнутого водоснабжения. В результате исследований были определены новые референтные значения оценки подвижности сперматозоидов осетровых рыб (сибирский и русский осетры, гибриды бестер и РО×ЛО, стерлядь), включающие нормативные значения криволинейной скорости, прямолинейной скорости и скорости вдоль усредненной траектории для сперматозоидов класса $A \geq 50,00$ мкм/с, для класса $B < 50,00$ мкм/с, среднего угла смещения для класса $A \leq 20,00$, для класса $B > 20,00$, отличающиеся делением на классы (A, B, C, D) и соотношением классов, что позволяет использовать их в методике компьютерного автоматического анализа спермы (CASA) технологии искусственного оплодотворения

Ключевые слова: аквакультура, сибирский осетр, ленский осетр, сперма, сперматозоиды, CASA, подвижность.

Modern methods of computer diagnostics of sperm quality using high-speed imaging and specialized software make it possible to accurately determine the trajectory of movement and speed of sperm.

Automatic computer analysis of spermatozoa motility (CASA) allows for an accurate assessment of motility indicators such as curvilinear speed, rectilinear speed, average speed along the trajectory, linearity. The data obtained make it possible to give an objective assessment of the quality of sperm and overcome the subjectivity of interpretation inherent in a standard spermo-gram. The aim of our research was to determine the optimal reference values of sperm motility for the method of computerized automatic semen analysis (CASA) in the breeding assessment of male sturgeon producers in artificial insemination when kept in recirculating water supply installations. As a result of the research, new reference values for assessing the mobility of

sturgeon spermatozoa (Siberian and Russian sturgeons, Bester and RO × LO hybrids, sterlet) were determined, including the standard values of curvilinear speed, rectilinear speed and speed along the average trajectory for class A spermatozoa $\geq 50.00 \mu\text{m/s}$, for class B $< 50.00 \mu\text{m/s}$, mean displacement angle for class A ≤ 20.00 , for class B > 20.00 , differing according to class division (A, B, C, D) and class ratio, which allows them to be used in the computer-aided automatic semen analysis (CASA) technique of artificial insemination technology

Key words: *aquaculture, Siberian sturgeon, Lena sturgeon, sperm, spermatozoa, CASA, motility.*

Введение. В настоящее время репродуктивная функция осетровых рыб, особенно в индустриальных условиях, снижается. В технологии искусственного воспроизводства любого живого объекта принципиально важным является осуществление эффективного оплодотворения яйцеклетки спермием. Для достижения данной задачи необходимым становится исследование качества получаемых половых продуктов с целью выявления и исключения из процесса оплодотворения полового материала, не соответствующего необходимым критериям качества.

Простое наблюдение спермы под микроскопом при 10–25-кратном увеличении до сих пор широко использовалось для того, чтобы оценить качество спермопродукции перед оплодотворением. Этот метод является неточным и субъективным. Компьютерный анализ спермы или CASA (Computer assisted sperm analysis) представляет собой практический инструмент, который был разработан в начале 1980-х годов. Он направлен на обеспечение более объективного анализа подвижности сперматозоидов путем реконструкции траектории сперматозоидов и их классификации по разным категориям для оценки качества спермы [1, 2, 5].

Современные методы компьютерной диагностики качества спермы с использованием высокоскоростной съемки и специализированного программного обеспечения позволяют осуществлять точное определение траектории перемещения и скорости спермиев. Автоматический компьютерный анализ подвижности сперматозоидов (CASA) позволяет проводить точную оценку таких показателей подвижности, как криволинейная скорость, прямолинейная скорость, средняя скорость движения по траектории, линейность. Получаемые данные позволяют дать объективную оценку качеству спермы и преодолеть субъективность интерпретации, присущей стандартной спермограмме.

В аквакультуре метод CASA еще не получил достаточного распространения, более того, вопрос с референтными значениями показателей подвижности сперматозоидов рыб в условиях аквакультуры при использовании CASA в настоящее время остается открытым. Также данный метод впервые используется для оценки подвижности сперматозоидов рыб, культивируемых в аквакультуре Беларуси.

Цель работы заключалась в определении оптимальных референтных значений подвижности сперматозоидов для метода компьютерного автоматического анализа спермы (CASA), в племенной оценке самцов-производителей осетровых рыб в искусственном оплодотворении при содержании в установках замкнутого водоснабжения.

Основная часть. В качестве объекта исследований была выбрана сперма самцов 5 видов и гибридов осетровых рыб, таких как сибирский осетр ленской популяции (*Acipenser baerii*, Brandt, 1869), русский осетр (*A. gueldenstaedtii*, Brandt, 1833), стерлядь (*A. ruthenus*, Linnaeus, 1758), гибрид бестер (*Huso huso* × *A. ruthenus*), гибрид РО×ЛО (*A. gueldenstaedtii* × *A. baerii*). Отбор спермопродукции осуществлялся при температуре воды 14,5 °С с помощью пластикового шприца Жане с катетером. Объем получаемой пробы составлял в среднем 100 см³. Получаемая сперма имела наивысший балл по 5-балльной шкале Персова.

Для исследования подвижности сперматозоидов использовалась система CASA, состоящая из тринокулярного электронного микроскопа с камерой и персонального компьютера с автоматизированным программным обеспечением ММС Сперм с последующим анализом данных в программе ImageJ. В качестве микроскопа использовался биологический тринокулярный микроскоп (тип Зидентофа) проходящего света ММС-KZ-900. Для анализа подвижности использовались одноразовые счетные стекла Leja с четырьмя камерами глубиной 10 микрон (точность ± 5 %) и объемом около 1 мкл. Для исследования подвижности сперматозоидов пробу разбавляли активирующей средой в соотношении 1:50. Состав активирующей среды: 10 мМ NaCl, 1 мМ CaCl₂, 10 мМ трис HCl, pH 8,5. Для исследований допускались образцы, подвижность которых превышала 90 %. Для предотвращения прилипания сперматозоидов предметные стекла обрабатывались 1%-ным сывороточным альбумином. В каждом видеоклипе оценивались от 20 до 70 сперматозоидов. Сперматозоиды со скоростью менее 3 мкм/с считались неподвижными и исключались из расчета подвижности. По результатам полученных данных определяли величину стимулирующего действия физических факторов на показатели подвижности сперматозоидов. Для записи подвижности сперматозоидов использовалась профессиональная цифровая камера для микроскопии ММС-31С12-М, созданная на основе КМОП сенсора Artina. Данная камера позволяла проводить цветную видеосъемку с частотой кадров 12, 60, 95 и 135 к/с при разрешении 2048×1536, 800×600, 640×480 и 512×384 соответственно. С помощью автоматизированного программного обеспечения ММС Сперм осуществлялся захват изображений и видеоклипов в формате AVI с камеры микроскопа. На основании полученных значений

скорости, сперматозоиды были разделены на две группы: группа А – сперматозоиды, имеющие скорость 30 и более мкм/с, группа В – сперматозоиды, имеющие скорость менее 30 мкм/с.

Результаты определения оптимальных референтных значений подвижности сперматозоидов осетровых рыб для метода CASA представлены на примере сибирского осетра ленской популяции.

В первом этапе классификации сперматозоидов на классы, как это принято при оценке сперматозоидов человека, использовалась визуальная оценка диаграммы одномерного рассеяния.

Так, к примеру, при оценке скорости вдоль криволинейной (реальной) траектории видно (рис. 1, а), что в пробе спермы существует группа сперматозоидов, которая визуально отделена от общей массы сперматозоидов. Это сперматозоиды с наиболее высокой скоростью вдоль криволинейной (реальной) траектории, которые можно отнести к классу А. При удалении из общего массива данных сперматозоидов класса А при статистическом анализе, была также выделена еще одна небольшая группа, занимающая промежуточное значение по данному показателю подвижности (рис. 1, б). Эти сперматозоиды были отнесены к классу В. Сперматозоиды, которые на диаграмме одномерного рассеяния занимали нижнее положение, но все-таки имели, пусть и минимальную, подвижность, относятся к классу С. Сперматозоиды, которые не имеют подвижности, можно отнести к классу D. Однако следует отметить, что в свежей сперме осетровых рыб таких сперматозоидов практически не наблюдалось.

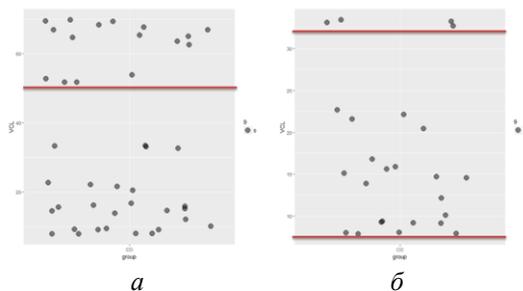


Рис. 1. Диаграмма одномерного рассеяния значений средней криволинейной скорости (VCL) сперматозоидов класса А (а), В и С (б)

Таким образом, используя визуальную оценку диаграммы одномерного рассеяния, удалось выделить три класса сперматозоидов из исследуемого материала (рис. 2, а).

Также классового разделения сперматозоидов сибирского осетра удалось достичь по таким показателям как скорость вдоль

прямолинейной траектории (рис. 2, б), скорости вдоль усредненной траектории (рис. 2, в) и по среднему углу смещения (рис. 2, г).

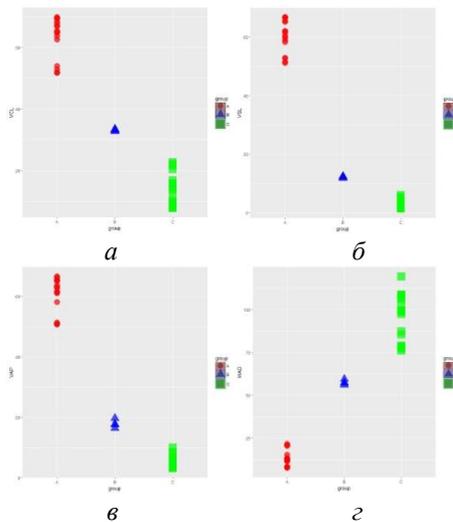


Рис. 2. Диаграммы одномерного рассеяния значений подвижности сперматозоидов сибирского осетра по средней криволинейной скорости (VCL) (а), средней прямолинейной скорости (VSL) (б), скорости вдоль усредненной траектории (VAP) (в) и по среднему углу смещения (MAD) (г)

При оценке прямолинейной усредненной траектории и числа колебаний реальной траектории относительно усредненной четких границ классовой дифференциации установить не удалось. И эти значения при оценке сперматозоидов осетровых рыб с целью их классовой дифференциации использовать не рекомендуется. Отдельно следует обратить внимание на такой показатель, как линейность реальной траектории. При визуальной оценке диаграммы одномерного рассеяния нами были выделены три класса сперматозоидов по этому показателю.

Однако при общей классификации сперматозоидов по всем признакам, данный показатель мог ошибочно относить сперматозоид к классу В или классу С. Это происходило из-за того, что низкие значения скорости сперматозоидов класса С вдоль прямолинейной траектории относительно скорости сперматозоидов класса С вдоль криволинейной (реальной) траектории могли давать ошибочные значения линейности реальной траектории, характерные для класса В. Эти значения при оценке сперматозоидов осетровых рыб с целью их классовой дифференциации использовать не рекомендуется.

Использование статистического метода построения ординационных диаграмм в программу R показал правильность осуществленных расчетов по классовому разделению сперматозоидов (рис. 3).

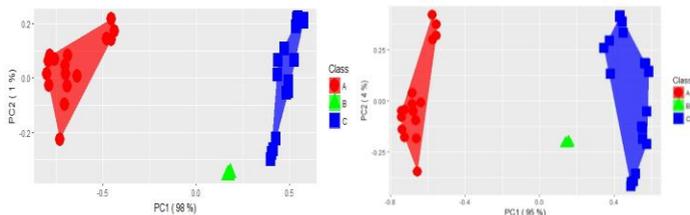


Рис. 3. Разделение сперматозоидов на классы методом построения ординационных диаграмм

Аналогичный методический подход к классовому разделению сперматозоидов был осуществлен и для других исследуемых видов: русский осетр, стерлядь, гибрид РО×ЛО, гибрид бестер.

В результате проведенных исследований был собран массив данных. Кроме статистического анализа уже названных показателей подвижности, производители оценивались по концентрации сперматозоидов, классовому долевному соотношению сперматозоидов всех классов, а также долевым суммам классов А и В согласно рекомендациям Всемирной организации здравоохранения.

Такие исследования были проведены на всех исследуемых видах осетровых рыб. Результаты оценки производителей сибирского осетра ленской популяции по подвижности сперматозоидов приведены в табл. 1.

Таблица 1. Результаты оценки самцов сибирского осетра

Классы подвижности				
Класс А, %	39,02 ± 2,3		Концентрация, млрд./мл	2,86 ± 0,2
Класс В, %	9,76 ± 1,6		Класс А, млрд./мл	1,12 ± 0,3
Класс С, %	48,78 ± 2,4		Класс В, млрд./мл	0,28 ± 0,1
Класс D, %	6,44 ± 1,2		Класс С, млрд./мл	1,40 ± 0,2
А+В, %	48,78 ± 2,8		Класс D, млрд./мл	0,07 ± 0,01
Средние значения по классам				
Класс	VCL (мкм/с)	VSL (мкм/с)	VAP (мкм/с)	MAD
Класс А	63,10 ± 1,65	60,09 ± 1,38	60,22 ± 1,48	12,80 ± 1,17
Класс В	33,16 ± 0,17	12,11 ± 0,13	17,87 ± 0,66	57,44 ± 0,72
Класс С	13,74 ± 1,13	2,54 ± 0,31	5,30 ± 0,42	94,37 ± 3,42
Класс D	—	—	—	—

Из данных табл. видно, что средняя криволинейная скорость (VCL) сперматозоидов классов А, В и С составила 63,10 ± 1,65, 33,16 ± 0,17 и

13,74 ± 1,13 мкм/с соответственно. Значения средней прямолинейной скорости (VSL) и скорости вдоль усредненной траектории (VAP) также были самыми высокими у сперматозоидов класса А и составили 60,09 ± 1,38 и 60,22 ± 1,48 мкм/с соответственно. Значение среднего угла смещения (MAD) было наименьшим у сперматозоидов класса А (12,80 ± 1,17), что говорит о более прямолинейном поступательном движении, чем у сперматозоидов класса В (57,44 ± 0,72) и С (94,37 ± 3,42).

Результаты оценки производителей русского осетра по подвижности сперматозоидов приведены в табл. 2.

Таблица 2. Результаты оценки самцов русского осетра

Классы подвижности				
Класс А, %	40,82 ± 2,3	Концентрация, млрд/мл	1,69 ± 0,2	
Класс В, %	16,33 ± 3,4	Класс А, млрд/мл	0,69 ± 0,1	
Класс С, %	40,82 ± 1,2	Класс В, млрд/мл	0,28 ± 0,2	
Класс D, %	2,04 ± 0,4	Класс С, млрд/мл	0,69 ± 0,1	
А+В, %	57,14 ± 3,4	Класс D, млрд/мл	0,03 ± 0,5	
Средние значения по классам				
Класс	VCL (мкм/с)	VSL (мкм/с)	VAP (мкм/с)	MAD
Класс А	62,67 ± 2,3	59,63 ± 2,4	60,24 ± 3,5	12,06 ± 1,4
Класс В	15,83 ± 2,5	4,93 ± 1,5	8,38 ± 2,5	83,88 ± 3,4
Класс С	13,58 ± 1,2	1,40 ± 0,5	4,13 ± 1,5	96,83 ± 1,5
Класс D	–	–	–	–

Из данных табл. видно, что средняя криволинейная скорость (VCL) сперматозоидов классов А, В и С составила 62,67 ± 2,3, 15,83 ± 2 и 13,58 ± 1,2 мкм/с соответственно. Значения средней прямолинейной скорости (VSL) и скорости вдоль усредненной траектории (VAP) также были самыми высокими у сперматозоидов класса А и составили 59,63 ± 2,4 и 60,24 ± 3,5 мкм/с соответственно.

Значение среднего угла смещения (MAD) было наименьшим у сперматозоидов класса А (12,06 ± 1,4), что говорит о более прямолинейном поступательном движении, чем у сперматозоидов класса В (83,88 ± 3,4) и С (96,83 ± 1,5).

Результаты оценки производителей гибрида РО×ЛО по подвижности сперматозоидов приведены в табл. 3.

Значение среднего угла смещения (MAD) было наименьшим у сперматозоидов класса А (14,80 ± 1,4), что говорит о более прямолинейном поступательном движении, чем у сперматозоидов класса В (89,18 ± 3,2) и С (100,90 ± 4,9).

Таблица 3. Результаты оценки самцов гибрида РО×ЛО

Классы подвижности				
Класс А, %	43,48 ± 2,5	Концентрация, млрд./мл	2,10 ± 0,9	
Класс В, %	17,39 ± 3,1	Класс А, млрд./мл	0,91 ± 0,3	
Класс С, %	36,96 ± 2,6	Класс В, млрд./мл	0,37 ± 0,2	
Класс D, %	2,17 ± 1,8	Класс С, млрд./мл	0,78 ± 0,1	
А+В, %	60,87 ± 4,5	Класс D, млрд./мл	0,05 ± 0,02	
Средние значения по классам				
Класс	VCL (мкм/с)	VSL (мкм/с)	VAP (мкм/с)	MAD
Класс А	65,66 ± 2,3	62,24 ± 2,3	62,14 ± 2,6	14,80 ± 1,4
Класс В	18,20 ± 1,3	6,78 ± 1,1	10,43 ± 1,3	89,18 ± 3,2
Класс С	16,78 ± 1,9	2,63 ± 0,2	6,55 ± 1,6	100,90 ± 4,9
Класс D	–	–	–	–

Аналогичные исследования были проведены также на стерляди и гибриде бестера.

На основании проведенных исследований предлагаются референтные значения (нормативы) при племенной оценке самцов-производителей осетровых рыб, используемых в искусственном оплодотворении при содержании в установках замкнутого водоснабжения для всех 5 видов и гибридных форм осетровых рыб (табл. 4).

Таблица 4. Референтные значения для CASA при племенной оценке самцов-производителей осетровых рыб

Показатель	Ленский осетр	Русский осетр	РО×ЛО	Бестер	Стерлядь
VCL (Класс А), мкм/с	≥ 50,00	≥ 50,00	≥ 50,00	≥ 50,00	≥ 50,00
VSL (Класс А), мкм/с	≥ 50,00	≥ 50,00	≥ 50,00	≥ 50,00	≥ 50,00
VAP (Класс А), мкм/с	≥ 50,00	≥ 50,00	≥ 50,00	≥ 50,00	≥ 50,00
MAD (Класс А)	≤ 20,00	≤ 20,00	≤ 20,00	≤ 20,00	≤ 20,00
VCL (Класс В), мкм/с	< 50,00	< 50,00	< 50,00	< 50,00	< 50,00
VSL (Класс В), мкм/с	< 50,00	< 50,00	< 50,00	< 50,00	< 50,00
VAP (Класс В), мкм/с	< 50,00	< 50,00	< 50,00	< 50,00	< 50,00
MAD (Класс В)	> 20,00	> 20,00	> 20,00	> 20,00	> 20,00
VCL (Класс С), мкм/с	< 30,00	< 30,00	< 30,00	< 30,00	< 30,00
VSL (Класс С), мкм/с	< 10,00	< 10,00	< 10,00	< 10,00	< 10,00
VAP (Класс С), мкм/с	< 15,00	< 15,00	< 15,00	< 15,00	< 15,00
MAD (Класс С)	> 60,00	> 60,00	> 60,00	> 60,00	> 60,00
VCL (Класс D), мкм/с	< 7,00	< 7,00	< 7,00	< 7,00	< 7,00
VSL (Класс D), мкм/с	< 1,00	< 1,00	< 1,00	< 1,00	< 1,00
VAP (Класс D), мкм/с	< 3,00	< 3,00	< 3,00	< 3,00	< 3,00
MAD (Класс D)	> 120,00	> 120,00	> 120,00	> 120,00	> 120,00
Концентрация, млрд./мл	≥ 2,5	≥ 1,5	≥ 2,0	≥ 2,0	≥ 1,5
Класс А, %	≥ 39,00	≥ 40,0	≥ 40,0	≥ 40,00	≥ 40,00
Класс В, %	≤ 10,00	≤ 15,00	≤ 15,00	≥ 25,00	≥ 25,00
А+В, %	≥ 45,00	≥ 55,00	≥ 60,00	≥ 65,00	≥ 65,00

Определение пороговых классовых значений по каждому показателю осуществлялось на основании расчета среднего значения минимальных пороговых классовых значений по каждой пробе рыб, принимавших участие в наших исследованиях с округлением до 0,1 (десятых) значений.

Закключение. Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что использование компьютерных программ для исследования качества спермы рыб является перспективным для аквакультуры, особенно для племенной работы с ценными и редкими видами рыб. Наиболее высоким качеством подвижности и выживаемости характеризуются сперматозоиды категории А. Поэтому при оценке качества производителей нами рекомендуется больше уделять внимания именно данной категории сперматозоидов, особенно при селекционно-племенной работе.

В результате исследований были определены новые референтные значения оценки подвижности сперматозоидов осетровых рыб (сибирский и русский осетры, гибриды бестер и РО×ЛО, стерлядь), включающие нормативные значения криволинейной скорости, прямолинейной скорости и скорости вдоль усредненной траектории для сперматозоидов класса А $\geq 50,00$ мкм/с, для класса В $< 50,00$ мкм/с, среднего угла смещения для класса А $\leq 20,00$, для класса В $> 20,00$, отличающиеся делением на классы (А, В, С, D) и соотношением классов, что позволяет использовать их в методике компьютерного автоматического анализа спермы (CASA) технологии искусственного оплодотворения [3, 4].

Использование предложенных научно обоснованных референтных значений подвижности, деление на классы и соотношение классов представляет практический интерес для рыбоводных хозяйств при оценке методом CASA племенных самцов производителей осетровых рыб (ленский и русский осетры, гибриды бестер и РО×ЛО, стерлядь) в установках замкнутого водоснабжения при применении искусственного оплодотворения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Feitsma, H. Do CASA Systems Satisfy Consumers Demands? A Critical Analysis. / H. Feitsma, M.L.W.J. Broekhuijse, B.M.Gadella // *Reprod. Domest. Anim.* – 2011. – Vol. 46, iss. s2. – P. 49–51.

2. Mortimer, S. T. A. critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals / S. T. Mortimer // *Hum. Reprod. Update.* – 1997. – Vol. 3, iss. 5. – P. 403–439.

3. Барулин, Н. В. Регулирование качества спермопродукции осетровых рыб в технологии воспроизводства объектов аквакультуры / Н. В. Барулин, К. Л. Шумский. – Горки, УО БГСХА, 2019. – 175 с.
4. Рекомендации по воспроизводству осетровых рыб в рыбоводных индустриальных комплексах с применением инновационных методов / Н. В. Барулин [и др.]. – Горки, Беларусь: УО «Белорусская государственная сельскохозяйственная академия», 2016. – 204 с.
5. Оценка подвижности сперматозоидов осетровых рыб в условиях аквакультуры / Н. В. Барулин [и др.] // Животноводство и ветеринарная медицина. – 2013. – № 4. – С. 10–15.