

## МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СПЕРМАТОЗОИДОВ ОСЕТРОВЫХ РЫБ В УСЛОВИЯХ КРАТКОСРОЧНОГО ХРАНЕНИЯ

К. Л. ШУМСКИЙ, Н. В. БАРУЛИН

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

(Поступила в редакцию 15.11.2021)

*Сперматозоиды – высокоспециализированные изолированные клетки, вырабатываемые только мужским организмом. Под воздействием внешней среды они, как и все клетки, подвержены изменениям. В результате действия неблагоприятных факторов происходит изменение структуры сперматозоида, что отражается на показателях подвижности и способности к оплодотворению. При оценке качества спермы рыб немаловажным является изучение морфологического строения сперматозоидов. Цель работы заключалась в изучении морфологической характеристики сперматозоидов осетровых рыб в условиях краткосрочного хранения. В качестве объекта исследований была выбрана сперма самцов 3 видов и 2 гибридов осетровых рыб, таких как сибирский осетр ленской популяции, русский осетр, стерлядь, гибрид бестер, гибрид РО×ЛО. Исследования установили, что в период краткосрочного хранения спермы осетровых рыб происходит изменение морфологических показателей, что выражается в увеличении доли агглютинации стадий А3, В2, С2, D1, E2 до 37,2; 12,42; 13,66; 11,18; 25,47 % соответственно, индекса тератозооспермии на 0,21 пунктов, индекса дефективности сперматозоидов на 0,71 пунктов.*

**Ключевые слова:** сперматозоиды, морфологические аномалии, агглютинация, индекс тератозооспермии, индекс дефективности.

*Spermatozoa are highly specialized isolated cells produced only by the male body. Under the influence of external environment, they, like all cells, are subject to change. As a result of the action of unfavorable factors, the structure of sperm cell changes, which is reflected in the indicators of mobility and the ability to fertilize. When assessing the quality of fish sperm, it is important to study the morphological structure of spermatozoa. The aim of the work was to study the morphological characteristics of sturgeon spermatozoa under short-term storage conditions. The object of research was the sperm of males of 3 species and 2 hybrids of sturgeon fish, such as the Siberian sturgeon of the Lena population, Russian sturgeon, sterlet, bester hybrid, RO × LO hybrid. Studies have established that during the short-term storage of sturgeon sperm there is a change in morphological parameters, which is expressed in an increase in the proportion of agglutination of stages A3, B2, C2, D1, E2 to 37.2; 12.42; 13.66; 11.18; 25.47 %, respectively, the teratozoospermia index by 0.21 points, the sperm defectiveness index by 0.71 points.*

**Key words:** spermatozoa, morphological abnormalities, agglutination, teratozoospermia index, defectiveness index.

### Введение

Выращивание ценных видов рыб является одним из реальных направлений повышения экономической эффективности индустриальной аквакультуры. Успешная разработка технологий выращивания таких объектов, как различные виды осетровых и их гибридов, канального и клариевого сома, тилапии и др. позволит повысить эффективность работы индустриальных рыбоводных хозяйств [2, 3, 5, 14, 16].

Аквакультура является единственным способом восполнения естественных популяций рыб. Особенно острым во всем мире является вопрос восстановления популяций осетровых рыб [1]. Многие десятилетия осетровые подвергались хищническому вылову. В результате человеческой деятельности были безвозвратно потеряны места естественного нереста. В настоящее время единственным способом получения товарной рыбы, а также восстановления и поддержания численности диких популяций осетровых рыб является их искусственное воспроизводство в условиях аквакультуры [4].

Воспроизводство осетровых рыб на данный момент возможно только при использовании искусственного оплодотворения. Результат оплодотворения икры напрямую зависит от качества используемых половых продуктов, в частности спермы. Оценка подвижности сперматозоидов получила широкое распространение в технологии искусственного воспроизводства, поскольку такой метод позволяет установить качество получаемых половых продуктов, выявить аномалии и предотвратить неэффективность оплодотворения. Современные методы компьютерной диагностики качества спермы позволяют проводить точные исследования на высоком методическом уровне [15].

Под воздействием внешней среды от семенников до оплодотворяющей жидкости сперматозоиды подвержены изменениям. В результате воздействия неблагоприятных факторов у рыб, как и у млекопитающих, наблюдаются изменения структуры спермы. Изменяется размер головки, длина жгутика и его форма [1]. В 90-е года начали появляться новые методы и технологии обработки и анализа изображений. Со временем они были адаптированы для описания морфологии сперматозоидов млекопитающих, что в результате вылилось в разработку ASMA (Automated Sperm Morphology Analysis – Ав-

томатизированный Анализ Морфологии Сперматозоидов). В последующем данный метод начал применяться для спермы рыб [7, 8, 9, 10, 12].

Особенно уязвимыми для повреждения местами, особенно от спонтанных изменений температуры, являются митохондрии и мембраны сперматозоидов [6].

Любые отклонения в строении сперматозоидов непосредственно влияют на результат оплодотворения. При увеличении числа аномальных сперматозоидов процент оплодотворения уменьшается. Также при оплодотворении яйцеклетки аномальными сперматозоидами наблюдаются высокие показатели отхода во время инкубации. Выявление и исключение из процесса воспроизводства пробы спермы с большим числом дефектных спермиев позволит значительно повысить результативность искусственного воспроизводства осетровых рыб [2].

Цель работы – исследование морфологической характеристики сперматозоидов осетровых рыб в условиях краткосрочного хранения.

#### **Основная часть**

Экспериментальные исследования выполнялись на базе кафедры ихтиологии и рыбоводства и рыбоводных хозяйств, работающих по технологии замкнутого водоснабжения: фермерское хозяйство «Василек» (Минская область), рыбоводный индустриальный комплекс УО БГСХА (с 2017 г. – рыбоводный индустриальный комплекс ОАО «Форелевое хозяйство «Лохва» (Могилевская область)). Лабораторные исследования выполнялись в лаборатории кафедры ихтиологии и рыбоводства Белорусской государственной сельскохозяйственной академии.

В качестве объекта исследований была выбрана сперма самцов 3 видов и 2 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×ЛЮ (*A. gueldenstaedtii* × *A. baerii*). Объем получаемой пробы спермы составлял в среднем 100 см<sup>3</sup>.

Процесс получения зрелых половых продуктов осетров начинался с зимовки и последующего вывода рыбы на нерестовую температуру и завершался гормональным стимулированием созревания гонад.

В исследованиях участвовали самцы возрастом 7 лет, средней массой 7,0 кг со средней длиной тела 99,5 см. Во время осенней бонитировки были отобраны особи бестера с гонадами, находящимися в III–IV и IV стадиях зрелости. Перед бонитировкой температура воды понижалась до 12 °С и прекращалось кормление рыбы.

Для определения стадий зрелости гонад использовался метод УЗИ диагностики. Зимовка проводилась при температуре воды 4–5 °С с возможным краткосрочным колебанием в диапазоне 2–7 °С. После вывода самцов на нерестовую температуру проводилось стимулирование созревания гонад с помощью однократной инъекции сурфагона (GnRH $\alpha$ ), являющегося синтетическим аналогом гонадотропин-релизинг-гормона млекопитающих. Инъекция осуществлялась с помощью медицинского шприца внутримышечно в область, расположенную между спинными и боковыми жучками на уровне 3–5 жучки [4].

Отбор спермопродукции осуществлялся при температуре воды 14,5 °С с помощью пластикового шприца Жане с катетером. Перед началом сцеживания рыбу тщательно протирали ветошью либо салфеткой для предотвращения попадания воды и слизи в сперму. Объем получаемой пробы составлял в среднем 100 см<sup>3</sup>. Получаемая сперма имела наивысший балл по 5-балльной шкале Персова. Пробирку с полученной спермой помещали в прохладное затемненное место [11].

В качестве микроскопа использовался биологический тринокулярный микроскоп (тип Зидентопфа) проходящего света ММС-KZ-900.

Для изучения морфологии осуществлялось окрашивание сперматозоидов по методу Diff-Quick. Мазки для окрашивания приготавливались путем нанесения на обезжиренное предметное стекло капли спермы и последующим распределением ее с помощью покровного стекла тонким равномерным слоем. Мазки обязательно высушивались перед окрашиванием. Для окрашивания использовался быстрый краситель «Дифф-Квик» фирмы «labor + Technik», выпускаемый под маркой «LT-SYS». Набор состоял из фиксирующего раствора и двух красителей. Окрашивание проводилось путем последовательного окунания мазка в фиксатор, затем краситель №1 (красный) и краситель №2 (синий). В каждый раствор мазок окунался пятикратно. Продолжительность каждого погружения 1 сек. Перед погружением в новый раствор предыдущему давали стечь с предметного стекла. После красителя № 2 мазок промывали дистиллированной водой и давали высохнуть. Подсохший мазок затем изучали под электронным микроскопом. При определении типов и стадий аглюцинации использовалась медицинская классификация (рис. 1) [13].

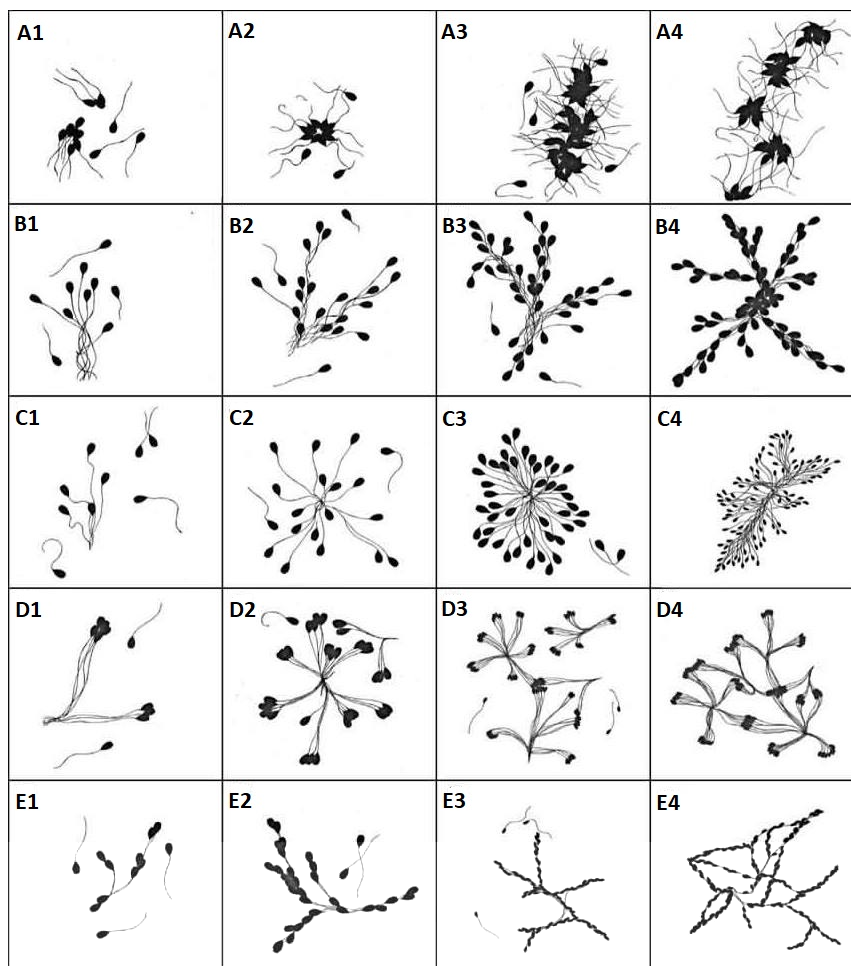


Рис. 1. Медицинская классификация агглютинаций сперматозоидов

На основании изучения морфологического строения сперматозоидов были рассчитаны следующие морфологические индексы: 1) индекс тератозооспермии, который представляет собой отношение суммарного числа дефектов к числу сперматозоидов с дефектами; 2) индекс дефектности сперматозоидов, который представляет собой отношение суммарного числа дефектов к числу подсчитанных сперматозоидов.

В процессе краткосрочного хранения было изучено морфологическое строение сперматозоидов. Наряду с нормально развитыми сперматозоидами наблюдались сперматозоиды с морфологическими аномалиями. Среди морфологических аномалий наиболее часто встречались сперматозоиды с макроцефальной головкой (рис. 2, а), с изогнутой средней частью (рис. 2, б), с коротким (рис. 2, в) или спиральным жгутиком (рис. 2, г).

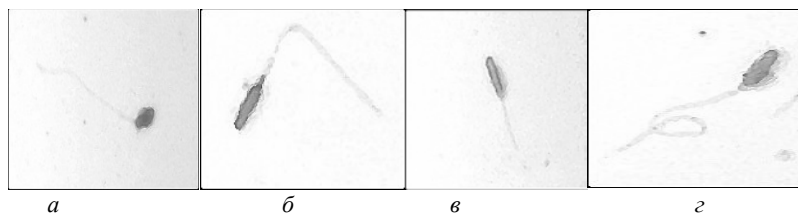


Рис. 2. Морфологические аномалии сперматозоидов: а – сперматозоид с макроцефальной головкой; б – сперматозоид с изогнутой средней частью; в – сперматозоид с коротким жгутиком; г – сперматозоид со спиральным жгутиком

Морфологические индексы сперматозоидов в процессе хранения спермы увеличиваются. Происходит резкое увеличение индекса дефектности сперматозоидов с 0,22 (на 2-й день) до 0,99 ( $P < 0,05$ ) (на 8-й день), что свидетельствует об увеличении числа аномалий в строении сперматозоидов. Рост индекса тератозооспермии с 1,0 (на 2-й день) до 1,21 ( $P < 0,05$ ) (на 8-й день) свидетельствует об увеличении численности сперматозоидов, одновременно имеющих 2 и более различных типов аномалий.

В процессе краткосрочного хранения наблюдается агглютинация (или склеивание) сперматозоидов. При этом были выявлены некоторые типы и стадии агглютинации.

Агглютинации типа А характеризуются слипанием только головок сперматозоидов. При этом были обнаружены стадия А2 (рис. 3, а), или средняя степень агглютинации, когда в агглютинате наблюдалось от 10 до 50 сперматозоидов, и стадия А3 (рис. 3, б), когда в агглютинате наблюдалось более 50 сперматозоидов на агглютинат.

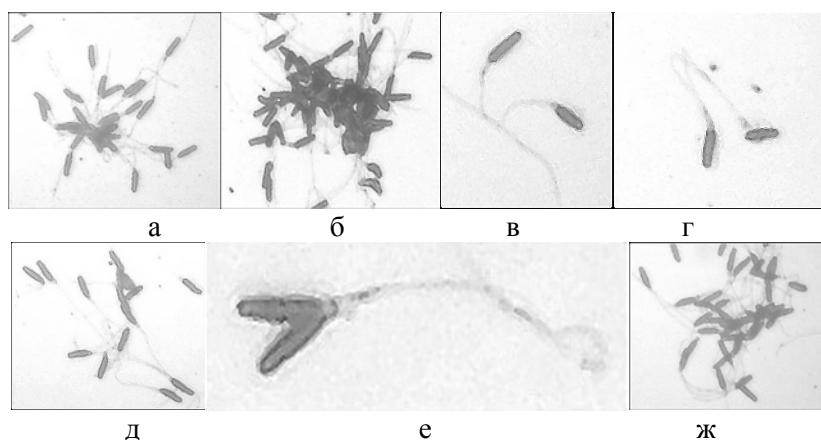


Рис. 3. Агглютинации: типа А, стадии А2 (а) и А3 (б); типа В, стадия В1 (в); типа С, стадии С1 (г) и С2 (д); типа D, стадия D1 (е); типа Е Стадия Е2 (ж)

Агглютинации типа В характеризуются слипанием только жгутиков сперматозоидов в средней части. При этом были обнаружены в основном стадия В1 (рис. 3, в), или слабая степень агглютинации, когда в агглютинате наблюдалось менее 10 сперматозоидов на агглютинат.

Агглютинации типа С характеризуются слипанием только кончиков жгутиков сперматозоидов. Были обнаружены стадии С1 (рис. 3, г) и С2 (рис. 3, д).

Агглютинации типа D характеризуются смешанным слипанием, т.е. одновременно происходит слипание головок сперматозоидов и средней части жгутиков. Была обнаружена только стадия D1 (рис. 3, е.).

Агглютинации типа Е характеризуются беспорядочным слипанием всех частей сперматозоида. В основном нами была обнаружена стадия Е2 (рис. 3, ж).

Было установлено, что в процессе краткосрочного хранения среднее количество агглютинаций в поле зрения микроскопа возросло с 1 (на 2 день хранения) до 5,6 ( $P < 0,05$ ) (к 8-му дню хранения).

Было также замечено, что в процессе хранения количество типов и тяжесть стадий возрастает. Так, на второй день хранения подавляющее большинство агглютинаций (76,92 %) относились к умеренной степени (А1). Агглютинации в слабой степени В1, С1, D1 составили по 7,69 % каждая.

На восьмой день хранения большая часть агглютинаций 37,27 % находилась в стадии А3 (значительная степень слипания). Также появились агглютинации в новой стадии Е2 (25,47 %). Агглютинации стадий В2, С2 и D1 составили 12,42, 13,66 и 11,18 % соответственно.

### Заключение

Нами впервые представлены данные по морфологической характеристике спермы осетровых рыб в условиях искусственного выращивания, а также их динамика в течении краткосрочного хранения. Установлено, что в период краткосрочного хранения спермы осетровых рыб происходит изменение морфологических показателей, что выражается в увеличении доли агглютинации стадий А3, В2, С2, D1, Е2 до 37,2; 12,42; 13,66; 11,18; 25,47 % соответственно, индекса тератозооспермии на 0,21 пунктов, индекса дефективности сперматозоидов на 0,71 пунктов. Полученные результаты представляют практический интерес для методологических разработок по искусственному оплодотворению осетровых рыб, а также являются методологической основой для оценки спермы других видов рыб, выращиваемых в искусственных условиях, размножение которых происходит в условиях искусственного размножения.

### ЛИТЕРАТУРА

1. 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.
2. Рекомендации по воспроизводству осетровых рыб в рыбоводных промышленных комплексах с применением инновационных методов / Н. В. Барулин, В. Ю. Плавский, К. Л. Шумский [и др.]. – Горки, Беларусь: УО «Белорусская государственная сельскохозяйственная академия», 2016. – 204 с.

3. Перспективы выращивания товарной тилипии в условиях Припятского Полесья / Т. В. Козлова [и др.] // Вестник ПолесГУ. Серия природоведческих наук. – 2014. – № 1. – С. 38–43.
4. Чебанов, М. С. Руководство по искусственному воспроизводству осетровых рыб / М. С. Чебанов, Е. В. Галич. – Анкара: ФАО, 2013. – 325 с.
5. Bronzi, P. Global sturgeon aquaculture production: an overview / P. Bronzi, H. Rosenthal, J. Gessner // J Appl Ichthyol. – 2011. – Vol. 27. – P. 169 – 175.
6. Brouwers, J. F. In situ detection and localization of lipid peroxidation in individual bovine sperm cells / J. F. Brouwers, B. M. Gadella // Free Radical Biology and Medicine. – 2003. – Vol. 35, iss. 11. – P. 1382–1391.
7. Барулин, Н. В. Влияние различной концентрации разбавления спермы сибирского осетра на качественные и количественные показатели сперматозоидов в течение краткосрочного хранения / Н. В. Барулин, К. Л. Шумский // Животноводство и ветеринарная медицина. – 2018. – № 1(28). – С. 39–45.
8. Барулин, Н. В. Компьютерный анализ подвижности сперматозоидов ленского осетра в аквакультуре / Н. В. Барулин, К. Л. Шумский // Животноводство и ветеринарная медицина. – 2018. – № 3(30). – С. 11–16.
9. Шумский, К. Л. Влияние борной кислоты на качественные и количественные показатели сперматозоидов Сибирского осетра в течение краткосрочного хранения / К. Л. Шумский, Н. В. Барулин, М. М. Усов // Животноводство и ветеринарная медицина. – 2019. – № 1. – С. 3–10.
10. Оценка подвижности сперматозоидов осетровых рыб в условиях аквакультуры / Н. В. Барулин, Т. П. Юрченко, М. В. Шалак, Н. А. Садомов // Животноводство и ветеринарная медицина. – 2013. – № 4. – С. 10–15.
11. Studies on the semen biology and sperm cryopreservation in the sterlet (*Acipenser ruthenus* L.) / F. Lahnsteiner [et al.] // Aqua Res. – 2004. – Vol. 35, iss. 6. – P. 519–528.
12. Van Look, K. J. W. Automated sperm morphology analysis in fishes: the effect of mercury on goldfish sperm / K. J. W. Van Look, D. E. Kime // J. Fish Biol. – 2003. – Vol. 63, iss. 4. – P. 1020–1033.
13. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. Fifth edition. World Health Organization. – 2010. – 271 p.
14. Plavskii, V. Y. Fish embryos as model for research of biological activity mechanisms of low intensity laser radiation / V. Y. Plavskii, N. V. Barulin // Advances in Laser and Optics Research, 2010. – P. 1-47.
15. Плавский, В. Ю. Роль поляризации и когерентности оптического излучения во взаимодействии со сперматозоидами осетровых рыб / В. Ю. Плавский, Н. В. Барулин // Вопросы рыбного хозяйства Беларуси. – 2009. – № 25. – С. 56–63.
16. Барулин, Н. В. Комплекс диагностического мониторинга физиологического состояния ремонтно-маточных стад осетровых рыб в установках замкнутого водоснабжения Беларуси / Н. В. Барулин // Вестник Государственной полярной академии. – 2014. – № 1(18). – С. 19–20.