

УДК 639.3.034.2

КОМПЬЮТЕРНЫЙ АНАЛИЗ ПОДВИЖНОСТИ СПЕРМАТОЗОИДОВ ЛЕНСКОГО ОСЕТРА В АКВАКУЛЬТУРЕ

Н. В. БАРУЛИН, К. Л. ШУМСКИЙ

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

(Поступила в редакцию 05.03.2018)

Воспроизводство дикой рыбы, а также контролируемое воспроизводство в аквакультуре – биологические мероприятия, тесно связанные с репродуктивным успехом и, в частности, с оплодотворением зрелых ооцитов. Во время нереста гаметы рыб выделяются в воду, где они оплодотворяются. Как качество и количество самих гамет, так и окружающая среда оказывают влияние на эффективность оплодотворения. Поэтому оплодотворение является интегративной реакцией на множество факторов, которые могут скрывать изменения собственного качества сперматозоидов. Исследовательские обзоры [15, 16, 23] наглядно демонстрируют, что большинство характеристик спермы способствуют общему качеству, но ни одна из них не является достаточно интегративной, чтобы полностью описать способность спермы оплодотворять яйцеклетку.

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. С развитием высокоскоростной съемки и компьютерных технологий стали возможны исследования движения одновременно нескольких клеток с определением траектории их перемещения и скорости. Цель работы заключалась в оценке качества спермы ленского осетра с помощью компьютерного анализа подвижности сперматозоидов CASA. В качестве объекта исследований была выбрана сперма самцов ленского осетра. Наши исследования установили, что наиболее высоким качеством подвижности и выживаемости характеризуются сперматозоиды категории А. Поэтому при оценке качества производителей нами рекомендуется больше уделять внимания именно данной категории производителей, особенно при селекционно-племенной работе.

Ключевые слова: аквакультура, ленский осетр, сперма, сперматозоиды, краткосрочное хранение, подвижность.

Reproduction of wild fish, as well as controlled reproduction in aquaculture is biological activities closely associated with reproductive success and, in particular, with the fertilization of mature oocytes. During spawning gametes of fish are released into the water, where they are fertilized. Both the quality and quantity of gametes themselves, and the environment affect the efficiency of fertilization. Therefore, fertilization is an integrative response to a variety of factors that can hide changes in the quality of spermatozoa. Research reviews clearly demonstrate that most semen characteristics contribute to overall quality, but none of them is sufficiently integrative to fully describe the ability of the sperm to fertilize the egg. Assessment of mobility of spermatozoa has become widespread in the art of artificial reproduction, since this method allows you to establish the quality of obtained sexual products, identify abnormalities and prevent inefficiency of fertilization. With the development of high-speed photography and computer technology, it has become possible to study the movement of several cells simultaneously, determining the trajectory of their movement and speed. The aim of the work was to assess the quality of sperm of the Lena sturgeon using a computerized analysis of the motility of spermatozoa CASA. As the object of research, we selected the sperm of males of the Lena sturgeon. Our research has established that spermatozoa of category A are characterized by the highest quality of mobility and survival. Therefore, when evaluating the quality of producers, we recommend to pay more attention to this particular category of producers, especially in the breeding work.

Key words: aquaculture, the Lena sturgeon, sperm, spermatozoa, short-term storage, mobility.

Введение

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 [22]. Современные методы компьютерной диагностики качества спермы позволяют проводить точные исследования на высоком методическом уровне [9].

Сперматозоиды являются популярным биологическим объектом для оценки влияния факторов физической и химической природы на качество мужских половых продуктов, в том числе и рыб [2, 3, 10, 11]. Для достижения целей Государственной программы развития аграрного бизнеса на 2016–2020 гг. по увеличению объемов производства рыбного продукции необходимо уделять внимание проблемам искусственного воспроизводства рыб [1, 14].

В ветеринарии и животноводстве много лет известны следующие методы оценки качества спермы животных [5]: изучение анатомического строения сперматозоидов, объема эякулята, цвета, запаха, консистенции; оценка подвижности, густоты, интенсивности дыхания, резистентности, скорости обесцвечивания и др. В животноводстве оценку спермы по

подвижности проводят по десятибалльной системе. Наивысшую оценку – 10 баллов – дают сперме в том случае, если все спермии обладают поступательным движением; при оценке 9 баллов – 9 спермиев из 10 обладают прямолинейно-поступательным движением, при оценке 6 баллов – 6 из 10 и так далее [5].

Как и в животноводстве, в рыбоводстве используют похожие и методы оценки, однако со своими отличиями.

Активность выражают в баллах по шкале Персова, в которой за 5 баллов принимается быстрое поступательное движение всех спермиев; за 4 балла – быстрое поступательное движение большинства спермиев, но в поле зрения встречаются отдельные сперматозоиды, осуществляющие замедленное зигзагообразное, круговое или колебательное движение; за 3 балла принимается быстрое поступательное движение части спермиев, преобладает замедленное зигзагообразное, круговое или колебательное движение, имеются неподвижные спермии; 2 балла – быстрое поступательное движение редко, у части спермиев колебательное движение, около 75 % спермиев неподвижно; 1 балл – все спермии неподвижны [17].

Концентрация спермы. Концентрация сперматозоидов в сперме легко оценивается различными методами, такими как подсчет под микроскопом, спектрофотометрией, проточной цитометрией и определение значений сперматокрыта [23]. Однако предлагаемые различные методы представляют некоторые неудобства: начиная от длительности метода, заканчивая дороговизной оборудования.

Морфология сперматозоидов. Сперматозоиды являются изолированными клетками, подверженными воздействию внешней среды. Более того, они могут быть повреждены ксенобиотиками, изменены генетической мутацией или старением, и, наконец, они могут быть частично деградированы при хранении. По этим различным причинам у млекопитающих наблюдались изменения структуры спермы, такие как длина жгутика или размер головки сперматозоида. Недавние методы анализа изображений были адаптированы в 90-х годах для описания морфологии сперматозоидов млекопитающих посредством разработки ASMA (Automated Sperm Morphology Analysis – Автоматизированный Анализ Морфологии Сперматозоидов). Этот метод был впервые применен к сперме рыб в Van Look and Kime [33] при изучении влияния увеличения дозы ртути на качество спермы. Использование ASMA и сканирующей электронной микроскопии подтвердило эффективность ASMA для быстрой оценки морфологии сперматозоидов [28], но необходимо подчеркнуть, что обе методики требуют химической фиксации клеток, которая может легко спровоцировать артефакты.

Целостность мембраны. На субклеточном уровне качество спермы можно оценить по целостности плазмиды мембраны сперматозоидов. Плазменная мембрана контролирует ионные и водные обмены между внутри- и внеклеточной средой, которые вызывают изгибы аксонемы механизмами, недавно рассмотренными Cosson et al. [19, 31] и Inaba [27]. С практической точки зрения, целостность мембраны изучалась путем оценки дифференциальной проникающей способности красителей, таких как эозин / нигрозин или эозин, и простое наблюдение под микроскопом в случае млекопитающих [36] и рыб [13].

Энергетическое содержание. Подвижность сперматозоидов поддерживается гидролизом АТФ, катализируемым АТФ-фосфогидролазой, который стимулирует скопление соседних дублетов микротрубочек в жгутике, что приводит к образованию жгутикового биения [25]. Впервые описывается Christen et al. [18] у форели, гидролиз АТФ регистрировался во время фазы движения у некоторых видов рыб, таких как карп (*Cyprinus carpio*), тюрбо (*Psetta maxima*), хрящевые (осетр) или морской окунь [21, 26, 29].

Подвижность сперматозоидов. Технологии оценки подвижности сперматозоидов были значительно улучшены за последние пять – десять лет [32, 19, 31, 16, 15]. Простое наблюдение спермы под микроскопом при увеличении между $\times 10$ и $\times 25$ с использованием предметного стекла с покровным стеклом или без него до сих пор широко использовалось для того, чтобы квалифицировать свойства сперматозоидов до их использования в

испытаниях на оплодотворение. Этот тип наблюдения обеспечивает грубую оценку качества спермы по критерию подвижности, поскольку он позволяет оценивать классы только в процентах от подвижной спермы и продолжительности моторики, определяемой периодом времени, ведущим к прекращению любого прогрессивного движения. Несмотря на то, что этот метод является неточным и субъективным, он выявил трудности объективного анализа подвижности сперматозоидов и позволил определить основы дальнейшего индивидуального анализа.

Все вышеперечисленные методы являются достаточно субъективными, с большим процентом ошибок, который очень сильно зависит от человеческого фактора.

С развитием высокоскоростной съемки и компьютерных технологий стали возможны исследования движения одновременно нескольких клеток с определением траектории их перемещения и скорости. Использование аппаратно-программных комплексов для определения концентрации, характеристики движения сперматозоидов, а также морфологических критериев клеток легло в основу новой технологии в лабораторной медицине – CASA (computer-assisted semen analysis) – компьютерного анализа подвижности сперматозоидов. CASA позволяет проводить оценку таких показателей подвижности, как криволинейная скорость, прямолинейная скорость, линейность. Совокупное использование полученных данных позволяет дать объективную оценку качеству спермы и преодолеть субъективность интерпретации, присущей стандартной спермограмме [6, 22]. Основное преимущество компьютерного анализа – это достоверное определение. В зависимости от количества одновременно находящихся в поле наблюдения сперматозоидов компьютер рассчитывает параметры движения либо всех, либо большей их части, что невозможно при ручном производстве спермограммы. Другое важное преимущество – воспроизводимость, т. е. результат исследования не зависит от лаборанта, производящего исследование, от уровня его подготовки, степени концентрации внимания или усталости. Можно быть уверенным, что проведенный одному пациенту анализ подвижности в разное время будет правильно отражать изменения показателей, исключая погрешности преаналитической стадии. Следующее преимущество – объективность: анализатор измеряет истинные скорости движения сперматозоидов, позволяя объективно судить о фертильности спермы [6, 22]. Совершенствование компьютерной морфологической диагностики позволяет получить принципиально новую количественную информацию, недоступную врачу при обычном визуальном анализе изображений под микроскопом [6].

Цель работы – оценка качества спермы ленского осетра с помощью компьютерного анализа подвижности сперматозоидов CASA.

Основная часть

В качестве объекта исследований была выбрана сперма самцов ленского осетра, выращенных от стадии личинки до половозрелого состояния в условиях установки замкнутого водоснабжения (фермерское хозяйство «Василек», Дзержинский р-н, Минская обл.). Возраст самцов 7 лет, средняя масса 7,0 кг, средняя длина 99,5 см. Самцов отбирали осенью, для возможного использования в воспроизводстве, с гонадами, находящимися в III–IV и IV стадиях зрелости. Осенняя бонитировка самцов проводилась при снижении температуры воды до 12 °С, при которой рыбу обычно прекращали кормить. Для отбора зрелых самцов при осенней бонитировке использовали метод определения стадий зрелости гонад при помощи неинвазивного экспресс-метода УЗИ. Температурный режим во время зимовки самцов составлял 4–5 °С. При этом допускалось кратковременное повышение температуры до 7 °С и ее понижение до 2 °С. Во время весенней бонитировки основным требованием к режиму преднерестового содержания самцов являлось сохранение их репродуктивных качеств. Поскольку самцы обычно готовы к нересту уже при кратковременном выдерживании при нерестовых температурах, наиболее эффективным приемом сохранения их репродуктивных качеств являлось содержание при невысоких температурах. Для стимулирования созревания самцов применяли суперактивный синтетический аналог гонадотропин-релизинг-гормона млекопитающих (GnRHа, сурфагон). Для инъекций использовали медицинские шприцы.

Инъекцию производили в спинные мышцы между спинными и боковыми жучками на уровне 3–5 спинной жучки. При введении препарата в мышечные ткани соблюдали осторожность и следили за тем, чтобы рыба при сжатии мышц не вытолкнула препарат. Отбор спермы осуществляли при помощи катетера и пластикового шприца Жане. Средний объем полученного эякулянта – 100 см³. Температура воды в период взятия половых продуктов составляла 14,5 °С. Вся отобранная сперма оценивалась в 5 баллов по 5-балльной шкале Персова. Для исследования подвижности спермиев пробу разбавляли водой в соотношении 1:20–1:50. Температура воды соответствовала температуре эякулята. Перед получением спермы производители обтирали полотенцем или марлевой салфеткой, особенно тщательно вытирали место у анального отверстия, а также анальный и хвостовой плавники. При этом следили, чтобы в пробирку не попали вода, полостная жидкость или экскременты рыбы. Пробирки со спермой ставили в холодильник или в холодное затененное место.

После проведения сцеживания спермы производили манипуляции по ее разбавлению. Разбавление осуществляли в сыворотке спермы, которую получали индивидуально для каждого самца. Получение сыворотки осуществляли методом центрифугирования при скорости вращения ротора 800 об/мин в течение 2 мин, а затем на оборотах 3500 об/мин в течении 10 минут. В сперму вносили полученную сыворотку в концентрации 1:10.

Исследуемая сперма помещалась в пробирки типа Eppendorf объемом 2 мл и хранилась в холодильнике при температуре 5 °С.

Подвижность сперматозоидов исследовали на тринокулярном (тип Зидентопфа) биологическом микроскопе проходящего света серии MMC-KZ-900, с независимой планхроматической оптической системой на бесконечность F=200мм. Для анализа подвижности использовали счетные камеры с фиксированной глубиной марки Leja. Запись подвижности сперматозоидов осуществляли при помощи видеокамеры MMC-31C12-M построенной на основе сенсора компании Aptina. Частота кадров в секунду - 12 к/с при разрешении 2048x1536, 60 к/с при 800x600, 95 к/с при 640x480, 135 к/с при 512x384. Для исследований качества спермы использовали автоматизированное программное обеспечение MMC Сперм, которое представляло собой основу для компьютерного спермоанализатора (CASA). Оценка концентрации сперматозоидов и анализ их подвижности производился на видеоклипах в формате AVI (захваченных в память компьютера или записанных на жесткий диск), на основе алгоритма анализа с учетом требований руководства Всемирной организации здравоохранения [4].

Для статистической обработки результатов использовали программную среду R, включая пакеты R Commander, MASS, ggplot2, mgcv, drc, corrplot [12, 30, 38, 37, 34, 20, 35, 24] и др. Статистическую достоверность различий оценивали по тесту Тьюки при условии соблюдения нормальности распределения данных (оценивалось тестом Шапиро-Уилка) и однородности групповых дисперсий (оценивалось тестом Ливина). При несоблюдении указанных условий использовали непараметрический тест Ньюмена-Кейлса [7, 8].

В большинстве случаев сперма, получаемая у рыб в условиях технологии искусственного воспроизводства, находится в неподвижном состоянии. Однако при добавлении обычной воды, в которой осуществляется выращивание и содержание рыб, сперматозоиды приобретают подвижность. Поэтому очень важно, в целях недопущения преждевременной активации, в процессе получения половых продуктов у самцов рыб тщательно вытирать полотенцем или марлевой салфеткой анальный и хвостовой плавники, а также место у анального отверстия. При этом необходимо следить, чтобы в пробирку не попали вода, полостная жидкость или экскременты рыбы. Простота получения, относительная доступность и массовость сперматозоидов животных и рыб делают их популярными объектами в биологических, ветеринарных и сельскохозяйственных исследованиях при изучении механизмов искусственного оплодотворения. Применение компьютерного анализа при исследовании качества спермы животных и рыб позволяет стандартизировать методику таких исследований и минимизировать субъективизм и человеческий фактор в процессе получения новых научных результатов.

Результаты исследований подвижности сперматозоидов ленского осетра в аквакультуре с использованием автоматизированного программного обеспечения представлены в таблице и на рис. 1.

Значения общей средней криволинейной скорости (VCL), а также общей подвижности сперматозоидов на 1 день после сцеживания спермы составили $57,30 \pm 1,39$ μ /с и $84,80 \pm 4,02$ % соответственно. Обращает на себя внимание высокий коэффициент вариации у значения VCL уже через 1 день после хранения. Это объясняется тем, что при регистрации общей средней криволинейной скорости учитываются сперматозоиды всех категорий,двигающихся поступательно, зигзагообразно и колебательно. Однако непосредственно в оплодотворении принимают участие сперматозоиды относящиеся к категории А, имеющие высокую скорость поступательных движений,двигающихся стремительно, преимущественно по линейной траектории. По этой причине высокий интерес имеет оценка подвижности сперматозоидов категории А.

Значения средней криволинейной скорости сперматозоидов категории А (VCL (А)), а также средней подвижности сперматозоидов категории А на 1 день после сцеживания спермы составили $60,93 \pm 1,01$ μ /с и $90,80 \pm 5,93$ % соответственно.

В дальнейшем, в процессе хранения спермы, показатели подвижности прогнозируемо снижались. Однако необходимо отметить следующие выявленные закономерности. На фоне ежедневного снижения показателей VCL, значения показателя VCL (А), начиная со второго дня остаются без изменений и даже недостоверно увеличиваются. Это объясняется тем, что при регистрации VCL учитывались сперматозоиды всех категорий, у которых в течение хранения значительно снижались показатели подвижности, что сказывалось на результатах средних значений VCL. При регистрации значений VCL (А) учитывались только результаты подвижности сперматозоидов категории А, которые характеризуются повышенной подвижностью и длительным сроком хранения.

Визуальную оценку подвижности сперматозоидов ленского осетра и изменения подвижности в процессе хранения можно осуществить при изучении траекторий движения, сформированных программой CASA на базе платформы ImageJ рис. 2. Как видно из представленных рисунков, через 1 день после сцеживания траектории сперматозоидов представляют собой прямые протяженные линии (рис. 2а), при этом присутствуют единичные траектории малоподвижных сперматозоидов. Через 4 дня после сцеживания (рис. 2б) появляются многочисленные траектории малоподвижных сперматозоидов. У линейнодвигающихся траекторий появляется большое количество незначительных так называемых «помех» или отклонений от линейной траектории.

Результаты измерений подвижности сперматозоидов ленского осетра с использованием автоматизированного программного обеспечения ММС Сперм

Показатель	День 1		День 2		День 3		День 4	
	Mean±SE	Cv, %	Mean±SE	Cv, %	Mean±SE	Cv, %	Mean±SE	Cv, %
VCL, μ /с	$57,30 \pm 1,39$	0,30	$39,90 \pm 1,67$	0,50	$46,85 \pm 1,50$	0,31	$17,08 \pm 2,42$	1,02
VCL (А), μ /с	$60,93 \pm 1,01$	0,20	$50,68 \pm 0,96$	0,19	$52,00 \pm 0,84$	0,15	$52,29 \pm 5,03$	0,53
Подвижность, %	$84,80 \pm 4,02$	0,08	$92,62 \pm 3,43$	0,06	$57,58 \pm 4,67$	0,14	$26,02 \pm 11,09$	0,73
Подвижность (А), %	$90,80 \pm 5,93$	0,11	$73,54 \pm 2,24$	0,05	$73,88 \pm 14,47$	0,33	$26,31 \pm 14,55$	0,95

Примечание. Mean – среднее значение; SE – стандартная ошибка среднего; SD – стандартное отклонение; Cv – коэффициент вариации, %; n – объем выборки.

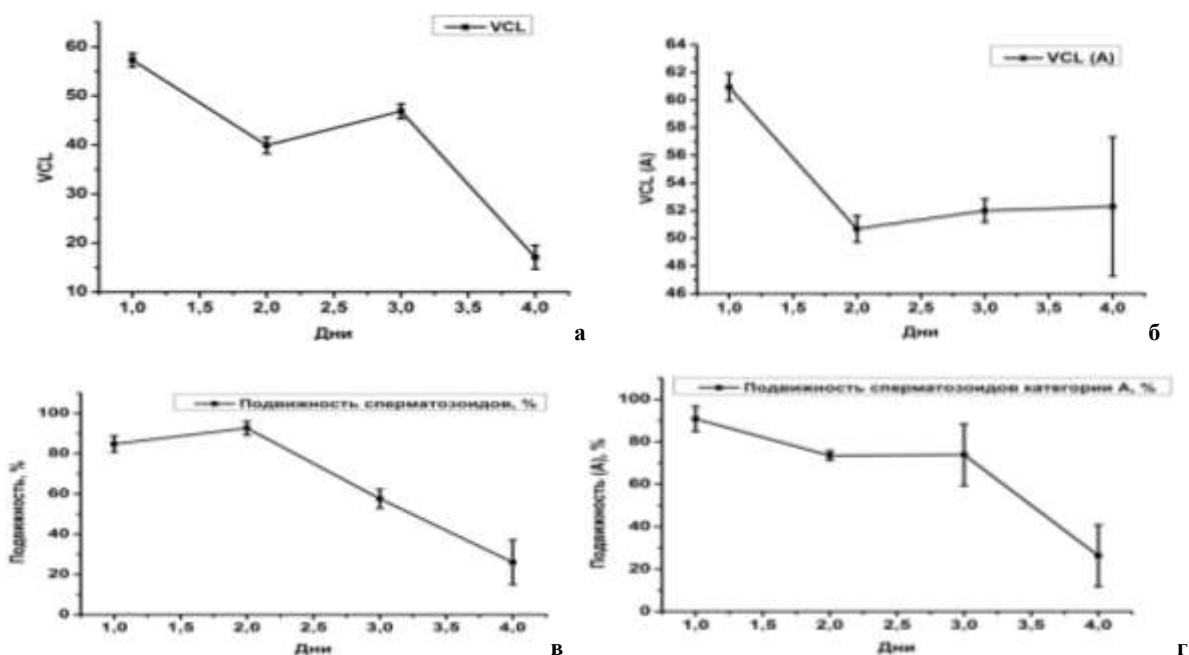


Рис. 1. Динамика изменения общей средней криволинейной скорости (а), средней криволинейной скорости сперматозоидов категории А (б), общей подвижности сперматозоидов (в), средней подвижности сперматозоидов категории А (г) сперматозоидов ленского осетра через 1, 2, 3, 4 дня после сцеживания

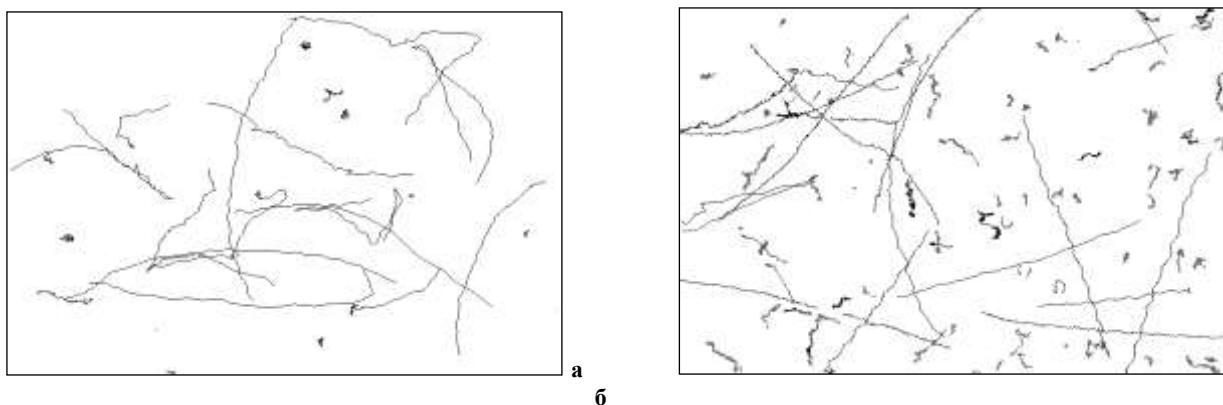


Рис. 2. Траектории движения сперматозоидов ленского осетра через 1 (а) и 4 (б) дня после сцеживания. Траектории движения сформированы программой CASA на базе платформы ImageJ

Такой подробный анализ подвижности, в случае необходимости оценки массового количества сперматозоидов от племенных производителей рыб, позволяет формировать сперму по категориям подвижности. Выделяя пробы с быстрым и прямолинейным движением; пробы с медленным прямолинейным движением; пробы с непрямолинейным движением и пробы с полностью неподвижными сперматозоидами. При этом появляется возможность выявлять умершие или умирающие «от старости» сперматозоиды на фоне здоровых, «молодых» сперматозоидов.

Заключение

Как показали наш опыт, использование компьютерных программ для исследования качества спермы рыб является перспективным для аквакультуры, особенно для племенной работы с ценными и редкими видами рыб. При этом компьютерный анализ дает ряд преимуществ. Например, захват изображений и видеоклипов в формате AVI с устройства ввода изображения, хранение текстовых данных, изображений и видеоклипов во встроенной базе данных, возможность проводить ручные измерения для индивидуальных задач. Наши исследования установили, что наиболее высоким качеством подвижности и выживаемости характеризуются сперматозоиды категории А. Поэтому при оценке качества производителей нами рекомендуется больше уделять внимания именно данной категории производителей, особенно при селекционно-племенной работе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Барулин, Н. В. Системный подход к технологии регулирования воспроизводства объектов аквакультуры в рыболовных индустриальных комплексах / Н. В. Барулин // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. (Серыя аграрных навук). – 2015. – № 3. – С. 107–111.
2. Барулин, Н. В. Жаброногий рачок *Artemia salina* L. как объект для исследования биологической активности оптического излучения низкой интенсивности / Н. В. Барулин, В. Ю. Плавский, В. А. Орлович // Вопросы рыбного хозяйства Беларуси. – 2012. – № 28. – С. 42–49.
3. Барулин, Н. В. Лазерное излучение как важный элемент технологии аквакультуры / Н. В. Барулин, М. В. Шалак, В. Ю. Плавский // Вестник Белорусской государственной сельскохозяйственной академии. – 2008. – № 3. – С. 82–85.
4. Оценка подвижности сперматозоидов осетровых рыб в условиях аквакультуры / Н. В. Барулин [и др.] // Животноводство и ветеринарная медицина. – 2013. – № 4. – С. 10–15.
5. Комлык, И. П. Биотехника размножения. Рабочая тетрадь с методическими указаниями для лабораторно-практических занятий по курсу «Акушерство, гинекология и биотехника размножения животных» / И. П. Комлык, В. Ю. Сиротинина. – Петрозаводск: ПГУ, 2002. – 43 с.
6. Лабораторная диагностика мужского бесплодия / В. В. Долгов [и др.]. – М. – Тверь, 2006. – 145 с.
7. Мастицкий, С. Э. Статистический анализ и визуализация данных с помощью R / С. Э. Мастицкий, В. К. Шитиков. – Хайдельберг – Лондон – Тольятти. – 2014. – Электронная книга. – <http://r-analytics.blogspot.com>.
8. Мастицкий, С. Э. Визуализация данных с помощью ggplot2 / С. Э. Мастицкий. – М.: ДМК Пресс, 2017. – 222 с.
9. ММС Сперм [Электронный ресурс] / – Режим доступа: <http://www.mmcatalog.com/index.html>. – Дата доступа : 08.10.2017.
10. Плавский, В. Ю. Влияние лазерного излучения инфракрасной области спектра на устойчивость молоди осетровых рыб к дефициту кислорода / Н. В. Барулин, В. Ю. Плавский // Биомедицинская радиоэлектроника. – 2008. – № 8–9. – С. 65–74.
11. Плавский, В. Ю. Влияние модуляции низкоинтенсивного лазерного излучения на его биологическую активность / Н. В. Барулин, В. Ю. Плавский // Лазерная медицина. – 2009. – Т. 13. – № 1. – С. 4–10.
12. Шитиков, В. К. Экотоксикология и статистическое моделирование эффекта с использованием R / В. К. Шитиков – Тольятти: ИЭВБ РАН, 2016. – 149 с.
13. Adenosine Triphosphate Concentration and b-D-Glucuronidase Activity as Indicators of Sea Bass Semen Quality / L. Zilli [et al.] // Biol.Reprod. – 2004. – Vol. 70. – P. 1679–1684.
14. Barulin, N. V. Serum enzyme response of captive sturgeon brookstock *Acipenser baerii* Brandt 1869 females and two hybrids (bester=female *Huso huso* Linnaeus, 1758× male *Acipenser ruthenus* Linnaeus, 1758, and RsSs= *A. gueldenstaedtii* Brandt 1833× *A. baerii* Brandt 1869) to hormonal stimulation for spawning induction / N. V. Barulin // *Journal of Applied Ichthyology*. – 2015. – Vol. 2 (31). – P. 2–6.
15. Bobe, J. 2010: Egg and sperm quality in fish / J. Bobe, C. Labbé // *Gen. Comp. Endocrinol.* – 2010. – Vol. 165 (3) – P. 535–548.
16. Cabrita, E. Sperm quality assessment / E. Cabrita, V. Robles, P. Herraes // *Methods in reproductive aquaculture. Marine and freshwater species*. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, USA. – 2009. – ISBN 978-0-8493-8053-2.
17. Chebanov, M.S. Sturgeon hatchery manual / M.S. Chebanov, E.V. Galich. – FAO, Ankara. – 2013. – 303 p.
18. Christen, R. Trout sperm motility- the transient movement of trout sperm is related to changes in the concentration of ATP following the activation of the flagellar movement / R. Christen, J. L. Gatti, R. Billard // *European J. Biochem.* – 1987. – Vol. 166 (3). – P. 667–671.
19. Marine fish spermatozoa: racing ephemeral swimmers / J. Cosson [et al.] // *Reproduction*. – 2008. – Vol. 136 (3). – P. 277–294.
20. Dose-Response Analysis Using R / C. Ritz [et al.] // *PLOS ONE*. – 2015. – Vol. 10(12).
21. Effect of the aging process on the quality of seabass (*Dicentrarchus labrax*) semen. / C. Dreanno [et al.] // *J. Appl. Ichthyol.* – 1999. – Vol. 15. – P. 176–180.
22. Fauvel, C. Evaluation of fish sperm quality / C. Fauvel, M. Suquet, J. Cosson // *Journal of Applied Ichthyology*. – 2010. – Vol. 26, Iss. 5. – P. 636–643.
23. Fish Spermatology: Implications for Aquaculture Management / S. M. H. Alavi [et al.] // *Fish Spermatology*. Alpha Science international Ltd, Oxford. – 2008. – P. 397–460.
24. Fox, J. 2005. The R Commander: A Basic Statistics Graphical User Interface to R / J. Fox // *J. of Statistical Software*. – V. 14(9). – P. 1–42.
25. Gibbons, I. R. The biochemistry of motility / I. R. Gibbons // *Ann. Rev. Biochem.* – 1968. – Vol. 37. – P. 521–546.
26. H-1-NMR and P-31-NMR analysis of energy metabolism of quiescent and motile turbot (*Psetta maxima*) spermatozoa / C. Dreanno [et al.] // *J. Exp. Zool.* – 2000. – Vol. 286 (5). – P. 513–522.
27. Inaba, K. Molecular mechanisms of the activation of flagellar motility in sperm / K. Inaba // *Fish Spermatology*. Alpha Science international Ltd, Oxford. – 2008. – P. 267–280.
28. Morphometric characterization of sharpnose sea bream (*Diplodus puntazzo*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) spermatozoa using computer-assisted spermatozoa analysis (ASMA) / F. Marco-Jimenez [et al.] // *J. Appl. Ichthyol.* – 2008. – Vol. 24 (4). – P. 382–385.
29. Nucleotide content, oxydative phosphorylation, morphology, and fertilizing capacity of turbot (*Psetta maxima*) spermatozoa during the motility period / C. Dreanno [et al.] // *Mol. Reprod. Dev.* – 1999. – Vol. 53 (2). – P. 230–243.
30. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. – 2017. – URL <https://www.R-project.org/>.
31. Studying sperm motility in marine fish: an overview on the state of the art / J. Cosson [et al.] // *J. Appl. Ichthyol.* – 2008. – Vol. 24 (4) – P. 460–486.
32. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish / E. Rurangwa [et al.] // *Aquaculture*. – 2004. – Vol. 234 (1-4) – P. 1–28.
33. 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. – P. 1020–1033
34. Venables, W. N. Modern Applied Statistics with S / W.N. Venables, B.D. Ripley // Fourth Edition. Springer, New York. – 2002.

35. Wei, T. Corrplot: Visualization of a Correlation Matrix / T. Wei, V. Simko // R package version 0.77. – 2016. – <https://CRAN.R-project.org/package=corrplot>
36. Why the WHO recommendations for eosin-nigrosin staining techniques for human sperm vitality assessment must change / L. Bjorndahl [et al.] // J. Androl. – 2004. – Vol. 25 (5). – P. 671–678.
37. Wickham, H. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis / H. Wickham. – Springer-Verlag New York, 2009.
38. Wood, S.N. Fast stable restricted maximum likelihood and marginal likelihood estimation of semiparametric generalized linear models / S.N. Wood // Journal of the Royal Statistical Society (B). – 2011. – Vol. 73(1). – P. 3–36.