

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ РЕЖИМОВ ВЫРАЩИВАНИЯ САМЦОВ ДАНИО РЕРИО В ЭКСПЕРИМЕНТЕ *IN VIVO* НА КАЧЕСТВЕННЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ СПЕРМЫ

Н. В. БАРУЛИН, Ф. В. МИХЛЮК, А. В. МИХЛЮК, П. Н. КОТУРАНОВ, К. Л. ШУМСКИЙ

*УО «Белорусская государственная сельскохозяйственная академия»,
г. Горки, Республика Беларусь, 213407, e-mail: barulin@list.ru*

(Поступила в редакцию 22.09.2020)

*Цель работы заключалась в исследовании влияния различных технологических режимов выращивания самцов данлио рерио в эксперименте *in vivo* на качественные показатели спермы. Исследования выполнялись на базе кафедры ихтиологии и рыбоводства в 2020 г., в студенческой научно-исследовательской лаборатории «Физиология рыб». Были сформированы 3 группы самцов: группа № 1 – выдерживалась с постоянной циркуляцией воды и ежедневным кормлением сухими кормами; группа № 2 – выдерживалась с постоянной циркуляцией воды и кормлением живыми кормами; группа № 3 – выдерживалась без циркуляции воды, с ежедневной подменой и кормлением сухими кормами. Регистрировались следующие показатели: процент отдачи спермы, концентрация сперматозоидов, скорость вдоль прямолинейной траектории, скорость вдоль криволинейной (реальной) траектории, скорость вдоль усредненной траектории, амплитуда бокового смещения, линейность реальной траектории, прямолинейность усредненной траектории, колебание реальной траектории относительно усредненной, частота биения, средний угол смещения.*

Проведенные исследования установили, что лучшие показатели качества спермы были в группе, которые выдерживались в условиях постоянной циркуляции воды, а их кормление производилось живым кормом. Самцы данной группы показали лучшие значения по проценту созревания (процент отдачи спермы), а их сперматозоиды характеризовались лучшими значениями подвижности. Наши исследования установили, что живые корма благоприятно влияют на репродуктивную функцию самцов данлио рерио в лабораторных условиях. Мы предполагаем, что такая тенденция будет характерна для всех карповых рыб при выращивании как в лабораторных условиях, так и в условиях интенсивной аквакультуры.

Ключевые слова: *сперма рыб, корма, кормление, данлио рерио.*

*The aim of the work was to study the influence of different technological modes of growing zebrafish males in an *in vivo* experiment on the quality parameters of sperm. The research was carried out on the basis of Department of Ichthyology and Fish Farming in 2020, in the student research laboratory «Physiology of Fish». 3 groups of males were formed: group No. 1 – kept with constant water circulation and daily feeding with dry food; group No. 2 – kept with constant water circulation and feeding with live food; group No. 3 – kept without water circulation, with a daily change and feeding with dry food. The following indicators were recorded: the percentage of sperm return, sperm concentration, speed along a rectilinear trajectory, speed along a curved (real) trajectory, speed along the average trajectory, amplitude of lateral displacement, linearity of the real trajectory, straightness of the averaged trajectory, fluctuation of the real trajectory relative to the average, beat frequency, average offset angle.*

The studies carried out found that the better indicators of sperm quality were in the group that was kept in conditions of constant water circulation, and fish were fed with live food. The males of this group showed the best values for the percentage of maturation (percentage of sperm return), and their spermatozoa were characterized by the best values of mobility. Our studies have established that live food has a beneficial effect on the reproductive function of male zebrafish in the laboratory. We assume that this tendency will be typical for all cyprinids when reared both in laboratory conditions and in conditions of intensive aquaculture.

Key words: *fish semen, food, feeding, zebrafish.*

Введение

В технологии производства посадочного материала в промышленных условиях большое значение имеет искусственное воспроизводство рыб. В этом технологическом этапе особое значение имеет подготовка производителей к нересту и его физиологическое состояние [1–5].

В технологии искусственного воспроизводства рыб большое значение имеет качество спермы. Сперматозоиды неподвижны, пока находятся в спермиальной жидкости. При попадании в воду они сразу активизируются и начинают энергично, но недолго плавать. Длительность движения спермиев в воде и является показателем их активности. В периоде активности спермиев выделяют две стадии – поступательное и колебательное движения. В связи с тем, что оплодотворение икры осуществляется в период поступательного движения спермиев, длительность этого движения является для рыбоводов очень важным показателем, который характеризует качество 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 [6]. Современные методы компьютерной диагностики качества спермы позволяют проводить точные исследования на высоком методическом уровне [7]. Сперматозоиды являются популярным биологическим объектом для оценки влияния факторов физической и химической природы на качество мужских половых продуктов, в том числе и рыб [8].

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 и др. Совокупное использование полученных данных позволяет дать объективную оценку качеству спермы и преодолеть субъективность интерпретации, присущей стандартной спермограмме [8].

Пресноводные рыбы данио рерио (*Danio rerio*), также известные как зебрафиш (zebrafish) или зебраданио, широко представлены в речных системах Азии от Пакистана до Индии, в том числе в Юго-Восточной Азии; помимо этого, они популярны у аквариумистов. Простота содержания, быстрый жизненный цикл и принадлежность к позвоночным сделала рыб данио рерио популярным модельным объектом в различных биомедицинских исследованиях, направленных на изучение процессов функционирования генов, развития организма, анатомии, физиологических и поведенческих особенностей [9].

Чувствительность к различным видам экологических и технологических факторов делает данио рерио идеальным модельным организмом для изучения изменений окружающей среды. В качестве биологических индикаторов изменчивости берутся поведенческие изменения, экспрессия генов, морфология и физиология. Международная организация стандартизации впервые опубликовала отчет об использовании *Danio rerio* в токсикологических тестах в 1984 г. [10].

Цель работы заключалась в исследовании влияния различных технологических режимов выращивания самцов данио рерио в эксперименте *in vivo* на качественные показатели спермы.

Основная часть

Исследования выполнялись на базе кафедры ихтиологии и рыбоводства в 2020 г., в студенческой научно-исследовательской лаборатории «Физиология рыб» (научный руководитель лаборатории – Н. В. Барулин). В качестве объекта исследований была выбрана сперма самцов данио рерио, выращенных до половозрелого состояния, которые выдерживались в различных условиях кормления. Нами были сформированы 3 группы самцов, каждая группа включала в себя по 10 особей: группа № 1 – выдерживалась в аквариумной стойке с постоянной циркуляцией воды. Кормление производилось искусственным сухим кормом Tetramin Granules 2 раза в день; группа № 2 – выдерживалась в аквариумной стойке с постоянной циркуляцией воды. Кормление производилось живым кормом *Artemia salina* два раза в неделю (понедельник и четверг); группа № 3 – выдерживалась в термостате без циркуляции воды, с ежедневной подменой свежей воды 60 % от общего объема. Кормление производилось искусственным сухим кормом Tetramin Granules 2 раза в день.

Температура воды в период выращивания и взятия половых продуктов составляла 26,5 °С во всех исследуемых группах.

Для исследования подвижности спермиев пробу разбавляли водой в соотношении 1:45. Температура воды соответствовала температуре эякулята. Перед получением спермы производителей обтирали марлевой салфеткой, особенно тщательно вытирали место у анального отверстия, а также анальный и хвостовой плавники. При этом следили, чтобы в стеклянный капилляр не попали вода, полостная жидкость или экскременты рыбы.

Концентрацию сперматозоидов рассчитывали в камере Горяева. Образец сперматозоидов разводился в 200 раз водой, в которой находилась рыба. Камеру и покровное стекло насухо протирали марлей. Не допускали использование для протирки ватных тампонов из-за остающихся на стекле волокон. Покровное стекло аккуратно притирали к камере, слегка надавливая на него до появления цветных колец Ньютона. Заполнив камеру и выдержав 2 минуту для прекращения движения сперматозоидов, осуществляли подсчет сперматозоидов. При малом увеличении сперматозоиды подсчитывали в 5 больших квадратах разделенных на 16 малых (т.е. в 80 малых квадратах). Расчет числа сперматозоидов осуществляют по формуле: $X = (a \times 4000 \times 200) / 80$, где X – число сперматозоидов в 1 мкл; a – число сперматозоидов, посчитанных в 80 малых квадратах камеры Горяева.

Подвижность сперматозоидов исследовали на тринокулярном (тип Зидентофа) биологическом микроскопе проходящего света серии ММС-KZ-900 с независимой планахроматической оптической системой на бесконечность $F=200$ мм. 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.

В качестве основных параметров подвижности мы регистрировали следующие показатели: VSL – скорость вдоль прямолинейной траектории, VCL – скорость вдоль криволинейной (реальной) траектории, VAP – скорость вдоль усредненной траектории, ALH – амплитуда бокового смещения (отклонение головки относительно усредненной траектории), LIN – линейность реальной траектории, VSL/VCL (STR) – прямолинейность усредненной траектории, VSL/VAP (WOB) – колебание реальной траектории относительно усредненной, VAP/VCL (BCF) – частота биения, средняя частота, с которой реальная траектория пересекает усредненную, MAD – средний угол смещения.

Для обездвиживания самцов данио рерио использовали лекарственное средство из группы местных анестетиков – лидокаин. В наших исследованиях мы использовали лидокаин (аэрозоль 10 %), произведенного в фармацевтическом заводе ЭГИС ЗАО. Анестезирующее средство для рыб растворяли в технологической воде в емкости объемом 1 л, что обеспечивало поступление анестезирующего вещества через рот, жабры и кожу рыбы. Для пробуждения рыбы использовали отдельный резервуар с чистой водой, насыщенной кислородом. Средняя навеска рыбы составила 0,341 г.

Для статистической обработки использовали статистическую программу R с пакетами RCommander, corrplot и др. [11].

Основная часть

Влияние различных технологических режимов выращивания самцов данио рерио в эксперименте *in vivo* на процент отдачи спермы и ее концентрацию. Половая зрелость данио наступает в возрасте 5–8 месяцев. Самки, как правило, достигают длины 2,4–2,5 см. Самцы чуть поменьше – их размер колеблется около 2,3 см. Время года не имеет значения для процесса размножения. Намного важнее обеспечить обильное питание, которое запускает определенные биологические механизмы. Самки начинают выделять феромоны для привлечения самцов. Те в свою очередь выделяют особые гормоны, с помощью которых стимулируется овуляция у женских особей. В аквариумной воде происходит взаимодействие гомогенат и гонад из семенных желез самцов, что и приводит к оплодотворению формирующейся икры. Пары в этот период не разлучаются друг с другом. Обычно для успешного оплодотворения достаточно 8 часов совместного пребывания в одном аквариуме.

Результаты проведенных исследований представлены в табл. 1. Нами было установлено, что наиболее высокие показатели отдачи спермы были в группе № 2, в которой самцы выдерживались в аквариумной стойке с постоянной циркуляцией воды, их кормление производилось живым кормом *Artemia salina* два раза в неделю (понедельник и четверг). Процент отдачи спермы в этой группе составил $80 \pm 13,5$ % ($p < 0,05$). В группе № 1 – процент отдачи спермы составил $40 \pm 11,1$ %, в группе № 3 – $20 \pm 6,5$ %.

Таблица 1. Результаты влияния различных технологических режимов выращивания самцов данио рерио в эксперименте *in vivo* на процент отдачи спермы и ее концентрацию, $M \pm m$, $n=10$

№ группы	Процент самцов, отдавших сперму, %	Концентрация сперматозоидов млн./мл
1	40	$27,2 \pm 3,6$
2	80*	$23,9 \pm 2,8$
3	20	$23,0 \pm 2,7$

* здесь и далее, достоверность – $p < 0,05$.

У большинства рыб концентрация спермиев очень высокая – от 5 до 30 млн/мл – и значительно выше, чем у животных с внутренним оплодотворением. Это связано с приспособлением к оплодотворению в сложных условиях внешнего осеменения икры.

Исходя из данных, представленных в табл. 1, наибольшее среднее содержание сперматозоидов было у группы № 1 которая выдерживалась в аквариумной стойке с постоянной циркуляцией воды. Кормление которой производилось искусственным сухим кормом Tetramin Granules 2 раза в день и составило $27,2 \pm 3,6$ млн/мл. Однако отличия по концентрации сперматозоидов от других исследуемых групп были статистически недостоверными.

Влияние различных технологических режимов выращивания самцов данио рерио в эксперименте *in vivo* на подвижности сперматозоидов. Оценка подвижности сперматозоидов получила широкое рас-

пространение 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. Результаты проведенных исследований представлены в табл. 2.

Таблица 2. Результаты влияния различных технологических режимов выращивания самцов данио рерио в эксперименте *in vivo* на подвижность сперматозоидов, $n=10$

Параметры движения сперматозоидов	№ опытной группы		
	1	2	3
VCL, мкм/сек	30,75*	34,77*	20
VSL, мкм/сек	20,42*	23,44*	13
VAP, мкм/сек	20,71*	27,37*	14
ALH, °	1,51	1,28	1,2
BCF, биение/сек	1,63	2,61	2,9
LIN	0,72	0,67	0,69
STR	0,64	0,59	0,81
WOB	0,57	0,73	0,66
MAD, °	24,92	26,67	40

В результате исследований установлено, что в группе № 1 скорость сперматозоида вдоль прямой траектории (VSL) составила 20,42 мкм/сек, в группе № 3–13,00 мкм/сек. Максимальные значения были выявлены в группе № 2 и составили 23,44 мкм/сек.

Криволинейная скорость сперматозоида (VCL) в группе № 1 составила 30,75 мкм/сек, в группе № 3–20 мкм/сек. Максимальные значения были выявлены в группе № 2 и составили 34,77 мкм/сек. Средняя скорость сперматозоида по траектории (VAP) в группе № 2 составила 20,71 мкм/сек, в группе № 3–14 мкм/сек. Максимальные значения были выявлены в группе № 1 и составили 27,37 мкм/сек.

Амплитуда бокового смещения головки сперматозоида (ALH) в группе № 2 составила 1,28°, в группе № 3–1,2°. Максимальные значения были выявлены в группе № 1 и составили 1,51°.

Частота биения головки сперматозоида (BCF) в группе № 2 составила 2,61 биение/сек, в группе № 1–1,63 биение/сек. Максимальные значения были выявлены в группе № 3 и составили 2,9 биение/сек.

Линейность траектории движения сперматозоида (LIN) в группе № 3 составила 0,69; в группе № 2–0,67. Максимальные значения были выявлены в группе № 1 и составили 0,72.

Прямолинейность траектории движения сперматозоида (STR) в группе № 1 составила 0,64; в группе № 2–0,59. Максимальные значения были выявлены в группе № 3 и составили 0,81.

Колесание траектории движения сперматозоида (WOB) в группе № 3 составила 0,66, в группе № 1–0,57. Максимальные значения были выявлены в группе № 2 и составили 0,73.

Среднее угловое смещение сперматозоида (MAD) в группе № 2 составила 26,67°, в группе № 1–24,92°. Максимальные значения были выявлены в группе № 3 и составили 40,00°.

На основании проведенных исследований мы наблюдали, что в группе № 2 скорость сперматозоида вдоль прямолинейной траектории (VSL) была больше в 14,79 раза, чем в группе № 1 и в 80,31 раза больше, чем в группе № 3. Криволинейная скорость сперматозоида (VCL) в группе № 2 была больше в 13,07 раза, чем в группе № 1 и в 73,85 раза больше, чем в группе № 3. Средняя скорость сперматозоида по траектории (VAP) в группе № 2 была больше в 32,16 раза, чем в группе № 1 и в 95,5 раза, чем в группе № 3. Амплитуда бокового смещения головки сперматозоида (ALH) в группе № 1 была больше в 17,97 раза, чем в группе № 2 и в 25,83 раза больше, чем в группе № 3. Частота биения головки сперматозоида (BCF) в группе № 3 была больше в 11,11 раза, чем в группе № 2 и в 77,91 раз больше, чем в группе № 1. Линейность траектории движения сперматозоида (LIN) в группе №1 была больше в 4,34 раза, чем в группе №3 и в 7,46 раз больше, чем в группе № 2. Прямолинейность (STR) в группе № 3, была больше в 26,56 раза, чем в группе № 1 и в 37,28 раз, чем в группе № 2. Колесание (WOB) в группе № 2 была больше в 10,60 раза, чем в группе №3 и в 23,72 раз больше, чем в группе № 1. Среднее угловое смещение (MAD) в группе № 3 была больше в 49,98 раза, чем в группе № 2 и в 60,51 раз больше, чем в группе № 1.

Заключение

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что лучше показатели качества спермы были в группе, которая выдерживалась в условиях постоянной циркуляции воды, а их кормление производилось живым кормом. Самцы данной группы показали лучшие значения по проценту созревания (процент отдачи спермы), а их сперматозоиды характеризовались лучшими значе-

ниями подвижности. Наши исследования установили, что живые корма благоприятно влияют на репродуктивную функцию самцов данио рерио в лабораторных условиях. Мы предполагаем, что такая тенденция будет характерна для всех карповых рыб при выращивании как в лабораторных условиях, так и в условиях интенсивной аквакультуры, однако эта тема нашей дальнейшей работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. 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.
2. Барулин, Н. В. Рекомендации по воспроизводству осетровых рыб в рыбоводных промышленных комплексах с применением инновационных методов / Н. В. Барулин [и др.]. – Горки : БГСХА, 2016. – 203 с.
3. Барулин, Н. В. Стратегия развития осетроводства в Республике Беларусь / Н.В. Барулин // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя аграрных навук. – 2017. – № 2. – С. 82–90.
4. Плавский, В. Ю. Влияние лазерного излучения инфракрасной области спектра на устойчивость молоди осетровых рыб к дефициту кислорода / В. Ю. Плавский, Н. В. Барулин // Биомедицинская радиоэлектроника. – 2008. – № 8–9. – С. 65–74.
5. Kostousov, V. G. Development of industrial fish culture in Belarus / V. G. Kostousov, N.V. Barulin. – p. 44 – 48 // Handbook: Recirculation technologies in indoor and outdoor systems; Edited by: Peter Lengyel [et al.]. – Szarvas, Hungar: Research Institute for Fisheries, Aquaculture and Irrigation, 2013. – 92 p.
6. Fish Spermatology: Implications for Aquaculture Management / S. M. H. Alavi [et al.] // Fish Spermatology. Alpha Science international Ltd, Oxford. – 2008. – P. 397–460.
7. Bui-Klimke T. R. Ochratoxin A and human health risk: a review of the evidence / TR Bui-Klimke, F. Wu // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. – 2015. – Vol. 55(13). – P. 1860–1869.
8. 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.
9. Красильникова, А. А. Совершенствование процесса криоконсервации репродуктивных клеток самцов рыб / А. А. Красильникова // Диссертация на соискание ученой степени кандидат биологических наук по специальности 06.04.01 – рыбное хозяйство и аквакультура. – Астрахань. – 2015. – 149 с.
10. 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.
11. 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/>.