

## ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГОТОВНОСТИ САМОК ВЕСЛОНОСА К НЕРЕСТУ ПРИ ПОМОЩИ УЛЬТРАЗВУКОВОЙ ДИАГНОСТИКИ

**Н. В. БАРУЛИН, Р. Е. БОГДАНОВ**

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

*(Поступила в редакцию 15.02.2021)*

*Цель работы заключалась в оценке возможности определения готовности самок веслоноса к нересту при помощи ультразвуковой диагностики. Исследования выполнялись в 2020 г. на самках веслоноса 2004 года рождения, выращиваемых в карповых прудах ХПУ «Вилейка» РУП «Институт рыбного хозяйства». Сбор ооцитов и УЗИ-снимков гонад осуществлялся в процессе весенней преднерестовой бонитировки в ХПУ «Вилейка». Определение коэффициента поляризации (КП) и компьютерная обработка УЗИ-снимков осуществлялась на базе кафедры ихтиологии и рыбоводства УО БГСХА в СНИЛ «Физиология рыб». Извлечение ооцитов у самок веслоноса осуществлялось методом биопсии с последующим определением коэффициента поляризации. Ультразвуковые (УЗИ) исследования осуществляли с использованием ветеринарной системы Draminsky. Компьютерная обработка УЗИ снимков осуществлялась в программе ImageJ, с использованием инструментов Histogram и Plot Profile. Для статистической обработки использовали статистическую программу R.*

*В результате оценки возможности определения готовности самок веслоноса к нересту при помощи ультразвуковой диагностики, нами не было выявлено убедительных корреляционных связей между показателем зрелости ооцита (коэффициент поляризации) и цифровыми характеристиками УЗИ-снимков яичников самок веслоноса. По-нашему мнению необходимо продолжить такие исследования на других представителей отряда осетрообразных с привлечением более чувствительных методов УЗИ-диагностики и алгоритмов машинного обучения.*

*В результате наших исследований нами были выявлены убедительные корреляционные связи между диаметрами ооцита и цифровыми характеристиками УЗИ-снимков. Это является перспективным для оценки состояния ооцитов в технологии икорного осетроводства.*

*Использование методов машинного обучения и компьютерной обработки биологических изображений создают основы для создания систем машинного зрения для автоматической диагностики репродуктивной характеристики осетровых рыб УЗИ методом.*

**Ключевые слова:** *веслонос, ооциты, УЗИ, биопсия, коэффициент поляризация.*

*The purpose of the work was to assess the possibility of determining the readiness of paddlefish females for spawning using ultrasound diagnostics. The studies were carried out in 2020 on female paddlefish born in 2004, reared in the carp ponds of fish farm "Vileika" of RUE "Institute of Fisheries". The collection of oocytes and ultrasound images of gonads was carried out during the spring pre-spawning appraisal at the Vileika farm. The determination of polarization coefficient and computer processing of ultrasound images was carried out on the basis of the Department of Ichthyology and Fish Farming of Belarusian State Agricultural Academy in student research laboratory "Physiology of Fish". Extraction of oocytes from female paddlefish was carried out by biopsy followed by determination of polarization coefficient. Ultrasound studies were performed using the Draminsky veterinary system. Computer processing of ultrasound images was carried out in the ImageJ program, using the Histogram and Plot Profile tools. Statistical processing was performed using the statistical program R.*

*As a result of assessing the possibility of determining the readiness of paddlefish females for spawning using ultrasound diagnostics, we did not find convincing correlations between the oocyte maturity index (polarization coefficient) and the digital characteristics of ultrasound images of the ovaries of paddlefish females. In our opinion, it is necessary to continue such studies on other representatives of the sturgeon order with the involvement of more sensitive methods of ultrasound diagnostics and machine learning algorithms.*

*As a result of our research, we have identified convincing correlations between the diameter of oocyte and the digital characteristics of ultrasound images. This is promising for assessing the state of oocytes in the technology of caviar sturgeon breeding.*

*The use of machine learning methods and computer processing of biological images create the basis for the creation of machine vision systems for automatic diagnostics of the reproductive characteristics of sturgeons by ultrasound.*

**Key words:** *paddlefish, oocytes, ultrasound, biopsy, polarization coefficient.*

### **Введение**

Осетровые – древний вид рыб Северного полушария. Их история эволюции насчитывает около 200–250 миллионов лет. В прошлые века большая часть естественных запасов осетровых рыб населяла бассейны Азовского, Черного и Каспийского морей; 90 % мировых поставок раньше приходилось из этих регионов. Запасы дикого осетра характеризовались тенденцией к снижению с конца 1980-х из-за серьезной деградации среды обитания, а также чрезмерной эксплуатации как природных, так и культивируемых осетровых рыб для производства икры. Как результат, к 1997 г. Международный союз охраны природы (МСОП) перечислил все коммерчески используемые виды осетровых во всем мире в Приложении II правил СИТЕС, что требует согласования на международном уровне торговых квот, чтобы обеспечить защиту этих ценных видов [1].

Семейство веслоносных *Polyodontidae* отряда осетрообразных включает 2 рода и 2 вида, оба – эндемики: американский веслонос (*Polyodon spathula*), живущий в бассейне Миссисипи (США) и в других реках, впадающих в Мексиканский залив, и псефур, китайский веслонос (*Psephurus gladius*) – в бассейне Янцзы [2]. В последнее время в Беларуси осуществляется разработка технологий по выращиванию веслоноса в рыбоводных прудах, в т.ч. разработка технологий его искусственного воспроизводства [15]. В связи с чем разработка и совершенствование различных технологических приемов и методов ведения племенной работы веслоноса является актуальным.

Методы определения пола осетровых рыб различны: биопсия [3], лапароскопия [4], ультразвуковая диагностика [5], эндоскопический метод [6], биохимический метод [7], гормональный метод [8], метод определения пола по морфологическому строению головы [9] или спинных жучек [10–13]. Однако, несомненно, самым массовым в настоящее время методом определения пола является УЗИ-диагностика [5, 14, 15].

Методы определения готовности производителей осетровых к нересту все еще достаточно консервативны. До сих пор самым массово применяемым способом определения готовности производителей и их половых продуктов к инъекированию, препаратами, стимулирующими нерест, является определение коэффициента поляризации икры (ооцитов) [5], другими авторами ранее предпринимались попытки разработки похожих способов за счет использования биохимических и гормональных и др. методов [7, 8], однако они не получили массового распространения.

В практике аквакультуры УЗИ-диагностика используется не только для определения пола и стадий зрелости икры, но и готовности производителей к нересту. По нашему мнению, определение готовности производителей к нересту при помощи УЗИ-диагностики носит достаточно субъективный характер и определяется опытом специалиста, который проводит УЗИ-диагностику, а также персональными субъективными оценками.

В данной работе мы произвели попытку дать цифровую оценку получаемым УЗИ-снимкам гонад самок веслоноса и выявить закономерные связи с состоянием зрелости и готовности ооцитов к стимулированию.

Современное развитие цифровых технологий, программ обработки биологических изображений и статистических программ создало популярное и очень крупное направление для создания систем машинного зрения на основе искусственного интеллекта, в основе которого лежат алгоритмы машинного обучения [12].

Цель нашей работы заключалась в оценке возможности определения готовности самок веслоноса к нересту при помощи ультразвуковой диагностики.

#### **Основная часть**

Исследования выполнялись в 2020 г. на самках веслоноса 2004 года рождения, выращиваемых в карповых прудах ХРУ «Вилейка» РУП «Институт рыбного хозяйства» (Вилейский район). Сбор ооцитов и УЗИ-снимков гонад осуществлялся в процессе весенней преднерестовой бонитировки в ХРУ «Вилейка». Определение коэффициента поляризации (КП) и компьютерная обработка УЗИ-снимков осуществлялась на базе кафедры ихтиологии и рыбоводства УО БГСХА в СНИЛ «Физиология рыб» (научный руководитель Н. В. Барулин).

Извлечение ооцитов у самок веслоноса осуществлялось методом биопсии, при помощи осетрового щупа. Биопсии подвергались самки, гонады которых находились на IV завершенной стадии зрелости. Извлеченные ооциты перемещались в 3 % раствор формалина на 24 часа, с дальнейшим переносом в 96 % спирт на 24 часа. Затем ооциты подвергались разрезанию по линии от анимального к вегетативному полюсу. Коэффициент поляризации (КП) рассчитывался по методике, изложенной в Chebanov, Galich (2013) [5]. В процессе исследований был собран материал по 18 самкам веслоноса. Ультразвуковые (УЗИ) исследования осуществляли с использованием ветеринарной системы Draminsky, которая имела линейный датчик с поверхностью 40–60 мм и частотой 4–10 МГц. УЗИ сканирование гонад осуществляли во фронтальной (продольной) или поперечной плоскостях в районе 3–4-й условных брюшных жучек от анального отверстия. Компьютерная обработка УЗИ снимков осуществлялась в программе ImageJ с использованием инструментов Histogram и Plot Profile. При использовании инструмента Histogram анализировались следующие показатели: mean, StdDev, mode, min, max. При использовании инструмента Plot Profile анализировались следующие показатели: mean, min, max. Данные показатели позволяли осуществлять анализ УЗИ-снимков не по качественным признакам, а по

количественным (цифровым характеристикам). Для статистической обработки использовали статистическую программу R с пакетами RCommander, corrplot и др. [16]. Для выявления наличия линейной зависимости между несколькими предикторами (переменными) использовали метод мультиколлинеарности, который заключался в построении и анализе корреляционной матрицы. В ходе проведенных исследований нами был осуществлен сбор ооцитов самок веслоноса с дальнейшим определением КП. Чем ближе расположение ядра к анимальное полюсу, тем выше вероятность того, что ооциты готовы к воздействию препаратами, стимулирующими нерест. Количество собранных ооцитов составляло не менее 10 у каждой самки. В результате проведенного анализа нами было установлено, что среднее КП варьировало от 7,23 до 24,41.

В период весенней преднерестовой бонитировки нами также осуществлялось исследование гонад самок УЗИ методом. Как правило, УЗИ-снимки у самок, находящихся на IV стадии зрелости, характеризовались сильным снижением эхосигнала, однако, у самок, у которых наблюдалась резорбция ооцитов наблюдалось гиперэхогенность сигнала (рис. 1).

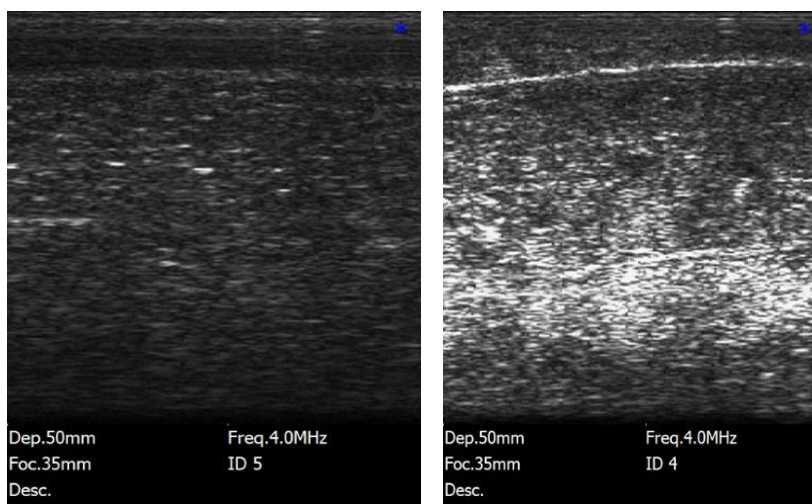


Рис. 1. Эхограмма продольного среза яичника 4-й стадии зрелости у самки веслоноса с признаками резорбции (справа) и без

После анализа УЗИ снимков, нами была составлена таблица для выявления корреляционных связей КП и диаметра ооцита с количественными характеристиками УЗИ-снимка: histogram (mean, StdDev, mode, min, max), plot Profile (mean, min, max в зоне 0 до 400 пикселей).

Для установления зависимостей между изучаемыми показателями (таблица), мы использовали корреляционный тест (тип Пирсона) с расчетом коэффициентов корреляции. В наших исследованиях мы принимали следующую силу корреляционной связи: очень слабая – от 0 до  $\pm 0,299$ ; слабая – от  $\pm 0,3$  до  $\pm 0,499$ ; средняя – от  $\pm 0,5$  до  $\pm 0,699$ ; высокая – от  $\pm 0,7$  до  $\pm 0,899$ ; очень высокая – от  $\pm 0,9$  до  $\pm 1$ . На первом этапе анализа мы устанавливали корреляционные связи между параметрами тех рыб, у которых КП был в пределах преднерестовых норм (7,23 до 24,41), т.е. у этих рыб было возможно определение КП и измерения диаметра ооцита, в отличие от рыб, ооциты которых находились или приближались к состоянию резорбции. Определение КП и диаметра у резорбируемых ооцитов было невозможно, в виду их очень рыхлой структуры. Результаты корреляционного теста в виде мультикорреляционной матрицы представлены на рис. 2.

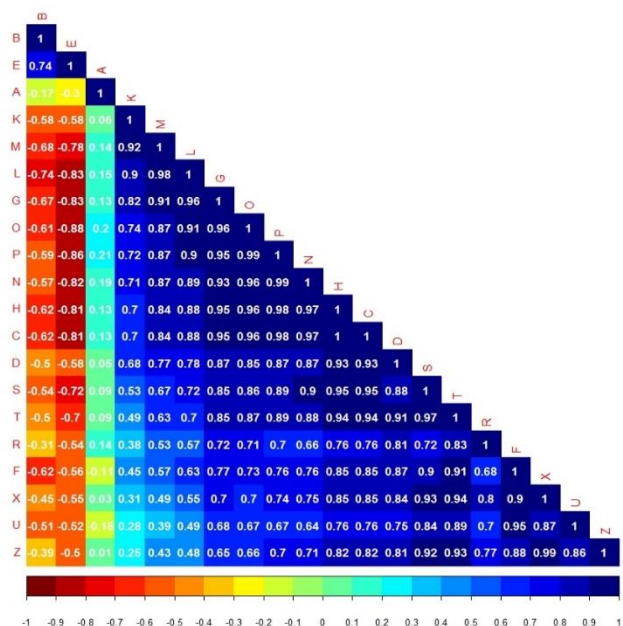


Рис. 2. Мультикорреляционная матрица анализа силы корреляционных связей между качеством ооцитов и цифровыми характеристиками УЗИ-снимков яичников самок веслоноса

В результате корреляционного теста мы установили, что КП ооцитов (символ А на рис. 3) самок веслоноса не имеет корреляционных связей не с одним цифровым параметром, характеризующим УЗИ-снимок (С – Z). Однако нами были выявлены соответствующие корреляционные связи для диаметра ооцита (В). Так, диаметр ооцита имел высокую силу отрицательной корреляционной связи с максимальным значением оттенков серого в диапазоне от 0–100 пикселей (L) в инструменте Plot Profile и высокую силу положительной корреляционной связи со значением Mode в инструменте Histogram (E), а также имел среднюю силу отрицательных корреляционных связей с большинством остальных параметров, характеризующих УЗИ-снимок.

Обнаруженные высокие силы корреляционной связи можно интерпретировать следующим образом: экзогенность гонад самок веслоноса уменьшается при увеличении диаметра ооцитов, находящихся в ней. На рис. 3 для сравнения показано изменение оттенков серого (Gray Value) в эхограмме яичников, ооциты которых имели средний диаметр 1,97 и 2,46 мм. Как видно из рисунка, график оттенка серого эхограммы яичника с ооцитами 1,97 мм в диаметре проходит по более верхним значениям оттенка серого, чем таковой для ооцитов с диаметров 2,46. Особенно ярко эти различия наблюдаются в зоне от 0 до 100 пикселей.

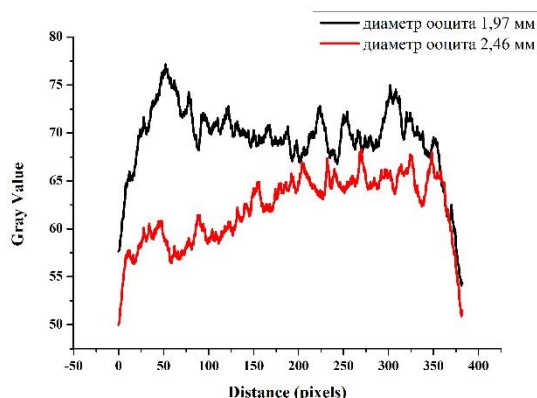


Рис. 3. Изменение оттенков серого в эхограмме яичников веслоноса, ооциты которых имели средний диаметр 1,97 и 2,46 мм

Сводные данные, характеризующие состояние ооцитов и цифровые характеристики УЗИ-снимков яичников самок веслоноса (n = 18)

КП		Диаметр яичника	Histogram					Plot Profile											
								Пиксели											
числа	бинарное выражение		Mean	StdDev	Mode	Min	Max	0-100			100-200			200-300			300-400		
							min	max	mean	min	max	mean	min	max	mean	min	max	mean	
А		В	С	Д	Е	Ф	Г	К	Л	М	Н	О	Р	С	Т	У	Х	З	
10,92	1	1,97	69,22	36,97	13995	54,11	77,16	57,67	77,16	70,62	67,06	72,79	69,79	66,78	73,45	69,52	54,11	74,97	67,30
12,97	1	2,17	75,41	42,35	14734	55,20	81,85	61,38	79,55	74,63	73,03	79,64	76,79	72,06	81,85	76,10	55,20	80,23	74,75
14,66	1	2,23	63,19	35,44	19705	51,36	68,66	56,57	66,02	62,64	59,94	68,05	63,48	59,51	68,66	64,65	51,36	67,18	62,50
11,31	1	2,22	65,43	34,12	17877	53,23	71,68	53,23	67,61	62,94	63,39	68,94	65,96	53,68	71,68	66,87	53,68	70,86	65,71
16,52	1	2,08	73,04	39,94	12901	53,31	86,50	70,60	86,50	78,78	72,57	82,38	77,42	67,18	75,37	71,71	53,31	69,48	63,11
8,82	1	2,17	63,74	33,01	17936	50,14	72,71	60,59	72,71	68,05	58,63	67,28	62,25	60,43	67,16	62,58	50,14	67,12	62,44
8,20	1	2,14	73,26	39,34	12914	55,86	81,11	55,86	75,14	66,53	69,13	80,42	74,81	75,66	81,11	78,43	59,80	80,08	74,23
8,65	1	2,18	67,41	32,81	14472	51,36	74,10	59,58	73,70	68,14	67,03	73,42	69,83	51,36	74,10	66,04	51,36	67,59	63,27
14,83	1	2,26	60,64	29,55	15467	47,82	69,05	52,73	68,87	64,56	58,99	69,05	63,98	55,48	60,75	58,05	47,82	59,36	55,61
24,41	1	2,22	70,09	35,89	13394	51,12	76,29	56,19	74,52	68,34	69,50	76,29	72,74	67,15	75,88	71,03	51,12	74,68	68,71
7,23	1	2,62	57,50	30,94	25783	48,71	63,48	50,17	59,15	56,16	54,83	59,73	56,83	55,87	60,96	58,51	48,71	63,48	59,46
8,19	1	2,35	72,27	39,58	13887	52,38	79,47	62,26	78,37	74,18	72,35	79,47	75,37	69,44	76,10	72,15	52,38	73,23	67,17
14,67	1	2,46	61,92	31,41	18373	50,00	68,30	50,00	61,45	58,14	58,47	65,76	62,06	63,09	68,30	65,05	50,91	67,97	63,32
-	0	-	58,84	31,74	20003	46,03	64,06	59,00	50,37	64,06	59,14	57,53	62,49	60,07	56,61	61,14	59,11	46,03	61,78
-	0	-	65,65	35,25	17507	49,18	76,59	65,82	62,36	76,59	71,55	64,06	69,89	66,71	61,33	66,44	63,82	49,18	64,71
-	0	-	65,16	33,88	17276	53,74	72,08	65,33	54,78	66,69	61,54	61,48	71,20	64,73	65,38	71,82	68,31	53,74	72,08
-	0	-	64,20	33,06	17555	51,90	69,06	64,37	54,40	68,74	64,50	61,18	68,62	64,95	60,00	69,06	64,07	51,90	68,81
-	0	-	58,84	31,74	20003	46,03	64,06	59,00	50,37	64,06	59,14	57,53	62,49	60,07	56,61	61,14	59,11	46,03	61,78

Различия в экзогенности яичников самок веслоноса, в зависимости от диаметра ооцита хорошо визуализируют рис. 4, полученные от обработки УЗИ-снимков в инструменте Surface Plot программы ImageJ.

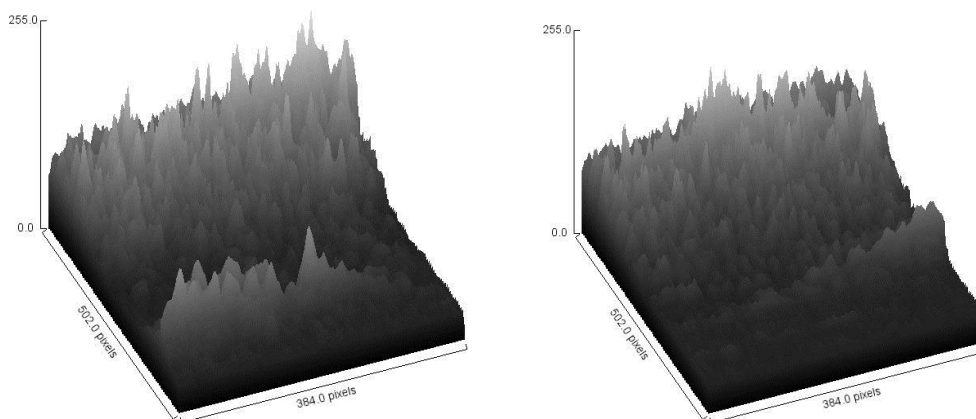


Рис. 4. Визуализация изменения экзогенности УЗИ-снимков яичников самок веслоноса с диаметром ооцитов 1,97 мм (слева) и 2,46 мм

На втором этапе анализа в исследуемые данные были добавлены значения от рыб, ооциты которых находились или приближались к состоянию резорбции. Поскольку у резорбируемых ооцитов не удалось определить КП и диаметр икры, то с целью установления зависимостей изучаемых показателей, значения КП были переведены в бинарное выражение, где 1 – соответствовала ооцитам, у которых КП был в пределах преднерестовых норм, 0 – соответствовали ооцитам, которые находились или приближались к состоянию резорбции. В результате корреляционного теста мы установили, что готовность ооцитов к стимулированию препаратами, не имеет корреляционных связей не с одним цифровым параметром, характеризующим УЗИ-снимок.

#### Заключение

Таким образом, в результате оценки возможности определения готовности самок веслоноса к нересту при помощи ультразвуковой диагностики, нами не было выявлено убедительных корреляционных связей между показателем зрелости ооцита (коэффициент поляризации) и цифровыми характеристиками УЗИ-снимков яичников самок веслоноса. По нашему мнению, необходимо продолжить такие исследования на других представителях отряда осетрообразных с привлечением более чувствительных методов УЗИ-диагностики и алгоритмов машинного обучения.

В результате наших исследований нами были выявлены убедительные корреляционные связи между диаметром ооцита и цифровыми характеристиками УЗИ-снимков. Это является перспективным для оценки состояния ооцитов в технологии икорного осетроводства.

Использование методов машинного обучения и компьютерной обработки биологических изображений создают основы для создания систем машинного зрения для автоматической диагностики репродуктивной характеристики осетровых рыб УЗИ методом.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. History, current status and prospects of sturgeon aquaculture in Russia / L. M. Vasilyeva [et al.] // *Aquac. Res.* – 2019. – Vol. 50. P. 979–993.
2. Козлов, В. И. Справочник фермера-рыбовода / В. И. Козлов. – М.: ВНИРО, 1998. – 342 с.
3. Sex identification and sexual maturity stages in farmed great sturgeon, *Huso huso* L. through biopsy / B. Falahatkar [et al.] // *Iran. J. Vet. Res.* – 2013. – V. 14. № 2. – P. 133–139.
4. Matsche, M. A. Use of laparoscopy to determine sex and reproductive status of shortnose sturgeon (*Acipenser brevirostrum*) and Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus oxyrinchus*) / M. A. Matsche, R. S. Bakal, K. M. Rosemary // *J. Appl. Ichthyol.* – 2011. – V. 27. – P. 627–636.
5. Chebanov, M. S. Sturgeon hatchery manual / M. S. Chebanov, E. V. Galich. – FAO, Ankara. – 2013. – 303 p.
6. Use of endoscopy for gender and ovarian stage determinations in Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*) grown in aquaculture / A. Hurvitz [et al.] // *Aquaculture.* – 2007. – Vol. 270. – P. 158–166.
7. Potential classification of sex and stage of gonadal maturity of wild white sturgeon using blood plasma indicators / M.A.H. Webb [et al.] // *Trans. Amer. Fish. Soc.* – 2002. – V. 131. – P. 132–142.
8. Мосягина, М. В. Состояние стероидсекреторных клеток и концентрация половых стероидных гормонов в плазме крови сибирского осетра *Acipenser baerii* и стерляди *A. ruthenus* (*Acipenseridae*) в период дифференцировки пола / М. В. Мосягина, О. В. Зеленников // *Вопросы ихтиологии.* – 2016. – Т. 56. – № 1. – С. 95–101.
9. Мальцев, А. В. Биометрический метод определения пола осетровых, в частности – русского осетра *Acipenser gueldenstaedtii* (*Acipenseridae*) азовской популяции / А. В. Мальцев // *Вопросы ихтиологии.* – 2006. – Т. 46. – № 4. – С. 536–540.

10. Барулин, Н. В. Идентификация пола осетровых рыб по костным пластинкам / Н. В. Барулин. – Горки: БГСХА, 2017. – 408 с. – ISBN 978–985–467–727–9.
11. Барулин, Н. В. Системный подход к технологии регулирования воспроизводства объектов аквакультуры в рыбноводных промышленных комплексах. В 2 ч. Ч. 1 / Н. В. Барулин. – Горки: БГСХА, 2018. – 268 с. ISBN 978–985–467–874–0.
12. Barulin, N. Using machine learning algorithms to analyse the scute structure and sex identification of sterlet *Acipenser ruthenus* (*Acipenseridae*) / N. Barulin // Aquaculture Research. – 2019. – Vol. 50. – P. 2810–2825. – doi: 10.1111/are.14233
13. Barulin, N. V. Intravital Sex Identification of Adult Sterlets *Acipenser ruthenus* (*Acipenseridae*) Based on the Morphological Structure of Dorsal Scutes / N. V. Barulin // Journal of Ichthyology. – 2018. – Vol. 58 (1). – P. 17–30. – doi: 10.1134/S0032945218010022.
14. Барулин, Н. В. Рекомендации по воспроизводству осетровых рыб в рыбноводных промышленных комплексах с применением инновационных методов / Н. В. Барулин, В. Ю. Плавский, К. Л. Шумский, Л. О. Атрощенко, Е. Г. Новикова, С. В. Роговцов, М. С. Лиман – Горки : БГСХА, 2016. – 203 с.
15. 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.
16. 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>.