



УДК 597.556.35-146.31:57.086

## Промысловые виды и их биология

# Применение цитометрии для анализа качества спермы рыб на примере черноморского калкана

А.Н. Ханайченко, В.С. Муханов

Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН (ФГБУН «ФИЦ Инбюом»), просп. Нахимова, д.2, Севастополь, 299011

E-mail: a.khanaychenko@gmail.com

SPIN-код: А.Н. Ханайченко – 6042-0080; В.С. Муханов – 3241-9675

**Цель работы:** разработка способа оценки качества спермы рыб по состоянию митохондрий сперматозоидов, которые связаны с их функциональной подвижностью.

**Метод:** для оценки качества спермы половозрелых разновозрастных самцов черноморского калкана из нерестовой популяции впервые был применён цитометрический анализ с предварительной окраской живых образцов спермы флуоресцентным красителем родамином 123, характеризующим мембранный потенциал митохондрий сперматозоидов.

**В результате исследований** определена индивидуальная вариабельность концентрации, размерного состава и флуоресценции окрашенных родамином сперматозоидов в сперме 27 половозрелых разновозрастных самцов калкана из одной нерестовой популяции. Концентрация сперматозоидов (с размером головки 2,2 мкм) в семенной жидкости калкана составляла, в среднем,  $2,8 \pm 1,3 \times 10^9$  кл мл<sup>-1</sup>, и варьировала индивидуально в пределах от 0,56 до  $4,98 \times 10^9$  кл мл<sup>-1</sup>. Доля флуоресцирующих (т. е. с окрашенными родамином 123 функциональными митохондриями) сперматозоидов составляла  $86,3 \pm 13,9\%$  от совокупности всех сперматозоидов в образцах спермы. Внутри большой группы окрашенных родамином 123 сперматозоидов хорошо выделялась субгруппа более крупных (около 2,4 мкм), наиболее ярко флуоресцирующих и, по-видимому, наиболее метаболически активных сперматозоидов, доля которых составляла  $16,2 \pm 3,8\%$ .

**Научная и практическая значимость:** разработанный цитометрический протокол обеспечивает более точную оценку функциональности сперматозоидов в сперме черноморского калкана и других видов рыб, и может быть применён для исследования состояния репродуктивных характеристик рыб из естественных популяций, селекции наилучших производителей при создании маточных стад для аквакультурной промышленности и оценки состояния спермы рыб до и после криоконсервации.

**Ключевые слова:** черноморский калкан *Scophthalmus maeoticus*, сперматозоиды, проточная цитометрия, родамин 123, флуоресценция.

## Flow Cytometric Analysis of Fish Sperm Quality: A Case Study of Black Sea Turbot

Antonina N. Khanaychenko, Vladimir S. Mukhanov

A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS («IBSS RAS»), 2, Nakhimov prospr., Sevastopol, 299011, Russia

**Objective:** the aim of this study was to develop a method for evaluating fish sperm quality based on the mitochondrial status of spermatozoa, which is linked to their functional motility.

**Methods:** to assess sperm quality of sexually mature Black Sea turbot males of different ages from a spawning population, flow cytometric analysis with preliminary staining of live sperm samples using the fluorescent dye rhodamine 123, which characterizes the membrane potential of spermatozoa mitochondria, was applied for the first time.

**Results:** individual variability in concentration, size composition, and fluorescence of rhodamine-stained spermatozoa was determined in the sperm of 27 sexually mature turbot males of different ages from the same spawning population. The concentration of spermatozoa (with a head size of 2.2  $\mu$ m) in turbot seminal fluid averaged  $2.8 \pm 1.3 \times 10^9$  cells ml<sup>-1</sup>, and individually varied from 0.56 to  $4.98 \times 10^9$  cells ml<sup>-1</sup>. The proportion of fluorescent spermatozoa (i. e., with functional mitochondria stained by rhodamine 123) was  $86.3 \pm 13.9\%$  of all spermatozoa in the sperm samples. Within the large group of rhodamine 123-stained spermatozoa, a sub-group of larger cells (approximately 2.4  $\mu$ m) with the most intense fluorescence and, apparently, the highest metabolic activity was clearly distinguished, comprising  $16.2 \pm 3.8\%$ .

**Novelty and Practical significance:** the developed cytometric protocol provides a more accurate assessment of spermatozoa functionality in the sperm of Black Sea turbot and other fish species. It can be applied for investigating reproductive characteristics of fish from natural populations, selecting the best breeders when creating broodstock for aquaculture, and evaluating fish sperm quality before and after cryopreservation.

**Keywords:** Black Sea turbot *Scophthalmus maeoticus*, sperm, spermatozoa, flow cytometry, rhodamin 123, fluorescence.

## ВВЕДЕНИЕ

Черноморский калкан *Scophthalmus maeoticus* (Pallas, 1814) – морской демерсальный вид рыб, один из наиболее ценных для промышленного рыболовства в Чёрном море и, потенциально, перспективный для промышленной аквакультуры. Морфологическая близость калкана к его ближайшему родственнику – атлантическому тюрбо, *S. maximus* (L., 1758) [Chenet, 2003; Voronina, 2010] дополняется конспецифичностью этих видов, которая была подтверждена молекулярно-генетическими исследованиями [Turan et al., 2019]. Популяции калкана распространены неравномерно по континентальному шельфу Чёрного моря ( $47^{\circ}\text{N}$ – $41^{\circ}\text{N}$ ,  $27^{\circ}\text{E}$ – $42^{\circ}\text{E}$ ), преимущественно на илисто-песчаных грунтах до глубин более 100 м. Массовый нерест калкана начинается в весенний период в разное время, в зависимости от региона Чёрного моря, но преимущественно проходит в течение 2-месячного периода с середины апреля до середины июня [Марти, 1939]. Несмотря на то, что репродуктивный потенциал популяции калкана обычно оценивают по характеристикам самок: их возрастному составу и размерам, гонадо-соматическому индексу, плодовитости, качеству икры [Гирагосов, 2020], эффективность нереста рыб в естественных популяциях, также как и их воспроизводство в условиях искусственного выращивания, в значительной степени определяется и репродуктивными характеристиками самцов. Результативность нереста может зависеть от состояния самцов, их способности к спермации и активности спермы. Качество спермы рыб р. *Scophthalmus* зависит от условий среды и питания и влияет на состояние здоровья потомства на ранних стадиях его развития [Liu et al., 2021]. Синергетический эффект влияния плохого качества мужских гамет может приводить и к низкому проценту нормального оплодотворения, и к низкому качеству потомства, что, в свою очередь, может стать причиной значительного снижения уровня воспроизводства популяции. Рыbam r. *Scophthalmus* свойственно исключительно внешнее моноспермное оплодотворение, при котором в яйцеклетку через видоспецифическое микропиле проникает только один сперматозоид [Bian et al., 2010]. При контакте с водой у выметанных ооцитов быстро уплотняется оболочка, через которую спермии уже проникнуть не могут, а период между соприкосновением икры с водной средой и возможным проникновением сперматозоида через микропиле у рыб r. *Scophthalmus* не превышает 20 сек. [Cosson, 2004]. Физиологические характеристики сперматозоидов обычно зависят от

целостности мембранны клетки и активности её митохондрий [Dreanno et al., 1999].

Прогрессивное движение сперматозоидов и их жизнеспособность зависят от состояния мембранного потенциала митохондрий (МПМ) сперматозоида. Известно, что МПМ положительно коррелирует с поглощением и интенсивностью флуоресценции родамина 123 (R123) [Evenson et al., 1982], который накапливается только в функциональных митохондриях живых клеток [Segovia et al., 2000] благодаря негативному потенциалу внутренней мембранны митохондрий [Liu et al., 2007]. Соответственно, интенсивность флуоресценции является индикатором состояния МПМ, которое, в свою очередь, коррелирует с потенциальной способностью спермы к оплодотворению [Panigagua-Chavez et al., 2006]. Интенсивность окраски сперматозоидов зависит как от количества митохондрий, так и от величины МПМ, характеризующих интенсивность метаболических процессов в клетке [Darzynkiewicz et al., 1982]. По интенсивности флуоресценции клеток, окрашенных R123, можно оценивать энергетические показатели сперматозоидов. Цитометрический анализ спермы может дать более точную оценку жизнеспособности сперматозоидов по сравнению с традиционными микроскопическими методами (оценка концентрации в камере Горяева и оценка подвижности сперматозоидов в мазке разбавленной спермы по разным шкалам) как по информативности, так и по скорости анализа.

**Целью работы** было разработать метод оценки состояния спермы рыб методом проточной цитометрии с применением флуоресцентного маркера МПМ родамина 123 (R123); определить размерный состав и концентрацию сперматозоидов в сперме черноморского калкана цитометрическим методом; оценить состояние МПМ сперматозоидов в зависимости от характеристик флуоресценции при окрашивании R123 и оценить возможную связь между МПМ сперматозоидов в образцах спермы и биологическими характеристиками самцов калкана.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

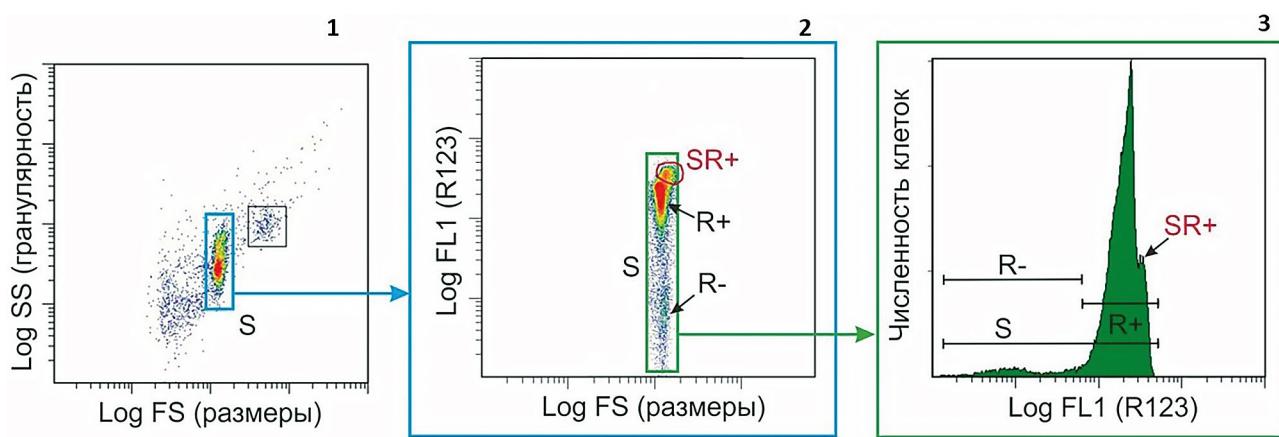
Для исследований использовали индивидуальные пробы спермы интактных половозрелых самцов черноморского калкана (27 экз.), отловленных с помощью камбальных жаберных сетей с размером ячей 200 мм на глубинах 50-95 м в акватории юго-западного шельфа Крымского полуострова с координатами  $44^{\circ}36'N$ ,  $33^{\circ}19'E$  –  $44^{\circ}39'N$ ,  $33^{\circ}28'E$  в течение естественного нерестового сезона (апрель-май) 2010 г. [Giragosov, Khanaychenko, 2012]. Поскольку загрязнение спермы отрицательно влияет на физиологическое

состояние сперматозоидов, снижая содержание внутриклеточного АТФ [Dreanno et al., 1998], до сцеживания спермы у рыб аккуратно опорожняли мочевой пузырь и кишечный тракт, генитальную область промывали водой, обсушивали, а после этого в процессе лёгкого абдоминального массажа получали чистую текущую сперму, которую отбирали в стерильные шприцы, оценивали общий объём разовой спермопродукции и до лабораторного анализа сохраняли без доступа воздуха и влаги в закрытых шприцах при температуре  $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$  (в термосе) соответственно стандартным условиям кратковременного хранения спермы рыб [Павлов, 2006].

После доставки проб (образцов) спермы калкана в лабораторию их разбавляли стерильной черноморской водой (1:10000) и окрашивали липофильным флуорохромным зелёным красителем R123 (Sigma-Aldrich, США, конечная концентрация 2 мкг/мл). Благодаря своим липофильным свойствам R123 проникает через плазматическую мембрану клетки, а наличие его катионных свойств определяет его накопление в функционирующих митохондриях клетки, несущих отрицательный заряд на своей внутренней мембране (согласно фото сканирующей электронной микроскопии спермы калкана (собств. неопубл. данные) – на муфтообразном выступе вокруг короткой центральной средней части его сперматозоида располагается не менее 9 митохондрий). Поглощённый R123 обеспечивает флуоресцентные изображения митохондрий с высоким разрешением, которые можно использовать для оценки состояния митохондрий и мембран-

ного потенциала митохондрий, и, соответственно для дифференцировки различных групп функционирующих и дисфункциональных сперматозоидов. Цитометрические исследования окрашенной родамином спермы калкана проводили с помощью проточного цитометра CytomicsTM FC 500 (Beckman Coulter, США), оборудованного 488 нм однофазным аргоновым лазером, и программного обеспечения CXR.

Идентификацию сперматозоидов и их подгрупп с разным состоянием ММП проводили на цитограммах на основе их размерных характеристик (светорассеивания) и флуоресценции R123 в зелёной области спектра (пример анализа пробы приводится на рис. 1). Общую численность сперматозоидов определяли с помощью их гейтинга на 2-параметрических цитограмме прямого (канал FS) и бокового (SS) светорассеивания, где они образовывали хорошо выраженный кластер точек (гейт S на рис. 1.1). Далее отдельно исследовали кластер S на 2-параметрических цитограммах размеров (FS) и зелёной флуоресценции R123 (канал FL1, 525 нм) (рис. 1.2), а также гистограмме FL1 (рис. 1.3), что позволяло количественно оценить интенсивность флуоресценции функциональных митохондрий. Соответственно, выделяли две группы сперматозоидов: неокрашенные (R-) и окрашенные R123 (R+) (рис. 1.2-1.3). Дополнительно, среди (R+) оценивали долю и уровень МПМ сперматозоидов с максимальной флуоресценцией (SR+), которые образовывали на цитограммах заметный субклuster точек на «вершине» кластера R+ (см. обозначение SR+ на рис. 1.2 и 1.3).



**Рис. 1.** Цитограммы спермы калкана, окрашенной родамином (R123) (разбавление 1:10000). Условные обозначения: совокупность всех сперматозоидов (S) (1.1), кластер неокрашенных сперматозоидов (R-), кластер окрашенных родамином сперматозоидов (R+) (1.2), субкластер (SR+) более крупных сперматозоидов с более интенсивной флуоресценцией R123 (1.3). Переменные прямого (FS) и бокового (SS) светорассеяния и зелёной флуоресценции R123 (FL1)

**Fig. 1.** Cytograms of turbot sperm stained with rhodamine (R123) (dilution 1:10000). Legend: total population of spermatozoa (S) (1.1), cluster of unstained spermatozoa (R-), cluster of rhodamine-stained spermatozoa (R+) (1.2), subcluster (SR+) of larger spermatozoa with more intense rhodamine 123 fluorescence (1.3). Variables of forward scatter (FS), side scatter (SS), and green fluorescence of rhodamine 123 (FL1)

Контроль качества цитометрических измерений проводили с помощью калибровочных флуоросфер Flow-Check™ (Beckman Coulter). Средние размеры сперматозоидов (их эквивалентный сферический диаметр – ESD) рассчитывали из соответствующих величин FS на основе калибровочных измерений, которые были проведены с набором полиэстеровых микросфер (Polysciences, Inc.) известного размера в диапазоне от 0,5 до 10 мкм.

Для всех самцов калкана, качество спермы которых оценивали с помощью цитометрического метода, был предварительно проведён биологический анализ по типовым методикам [Правдин, 1966]. Возраст рыб был определён по отолитам. Данные цитометрического анализа спермы самцов калкана были сопоставлены с данными биологического анализа черноморского калкана: общей длины (TL, см) и массы тела (W, г), и гонад (Wg, г), и коэффициентом упитанности рыб по Фултону (F). Коэффициент упитанности был рассчитан с использованием значений стандартной длины тела (SL, см), общей массы тела по уравнению в следующей форме: упитанность рыбы по Фултону  $F = W/SL^3 \times 100$ .

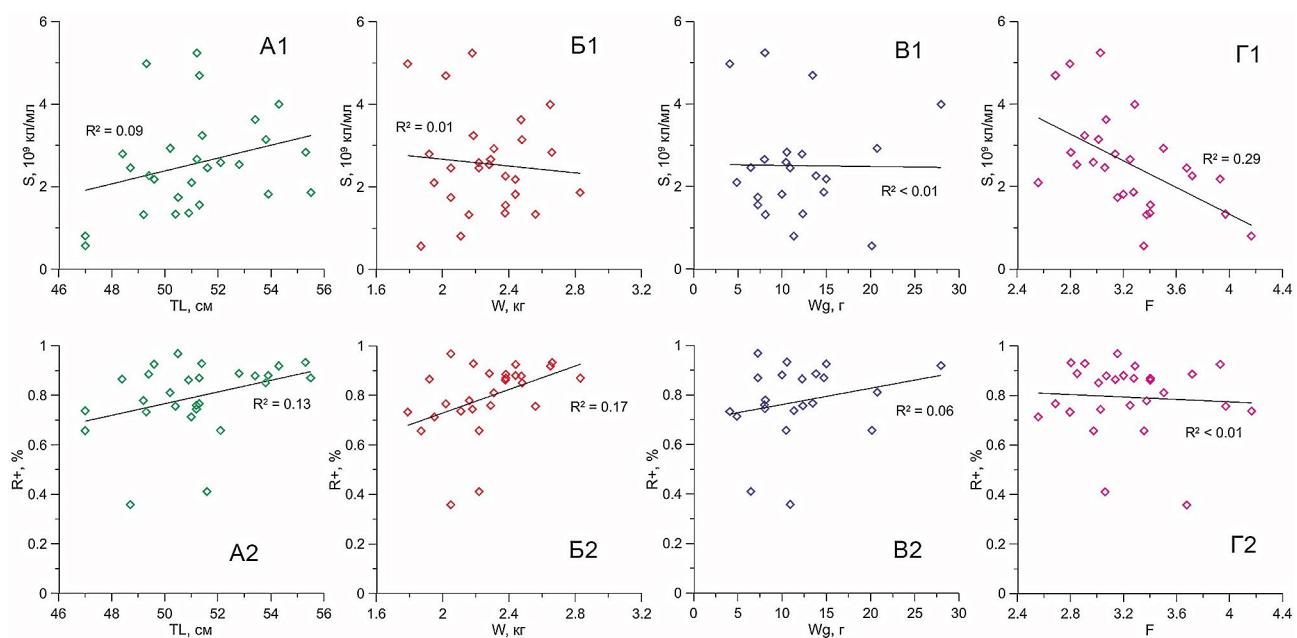
Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения Excel и Statistica 10. Значения были выражены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение. Односторонний дисперсионный анализ (ANOVA) был использован для анализа различий меж-

ду средними значениями данных. Различия считались достоверными при  $p < 0,05$ . Для анализа возможной связи цитометрических показателей спермы и биологических характеристик самцов был использован метод линейной регрессии. Построение модели линейной регрессии и расчёт коэффициента детерминации  $R^2$  проводили с помощью программы STATISTICA 10.0.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ спермы калкана проводили на статистически достоверной группе (27 экз.) половозрелых самцов с разбросом длины от 47 до 55,5 см и веса от 1,8 до 2,8 кг.

Согласно данным проведённого нами цитометрического анализа концентрация сперматозоидов ( $S$ ) в сперме черноморского калкана из природных популяций варьировала от 0,6 до  $5 \times 10^9$  кл  $\text{мл}^{-1}$ , в среднем для всех изученных проб составляя  $2,8 \times 10^9$  кл  $\text{мл}^{-1}$ . Индивидуальные пробы спермы, полученные от разных самцов, различались не только по концентрации сперматозоидов, но и по количественному соотношению входящих в них кластеров неокрашенных ( $R^-$ ) и окрашенных R123 сперматозоидов ( $R^+$ ). В среднем, доля кластера окрашенных родадином сперматозоидов ( $R^+$ ) в составе всей совокупности сперматозоидов составила  $86,3 \pm 13,9\%$ , варьируя на индивидуальном уровне от 41,1 до 93,3%. Доля сперматозоидов с бо-



**Рис. 2.** Зависимость общей концентрации сперматозоидов ( $S$ ) и доли окрашенных родадином 123 сперматозоидов ( $R^+$ ) в сперме калкана от биологических показателей самцов: длины, TL, см (A1 и A2), веса рыбы W, кг (B1 и B2), веса гонад Wg, г (B1 и B2), коэффициента упитанности F (Г1 и Г2)

**Fig. 2.** Relationship between the total concentration of spermatozoa ( $S$ ) and the proportion of rhodamine 123-stained spermatozoa ( $R^+$ ) in turbot sperm and male biological parameters: fish length, TL, cm (A1 and A2), fish weight W, kg (B1 and B2), gonad weight Wg, g (B1 and B2), condition factor F (Г1 and Г2)

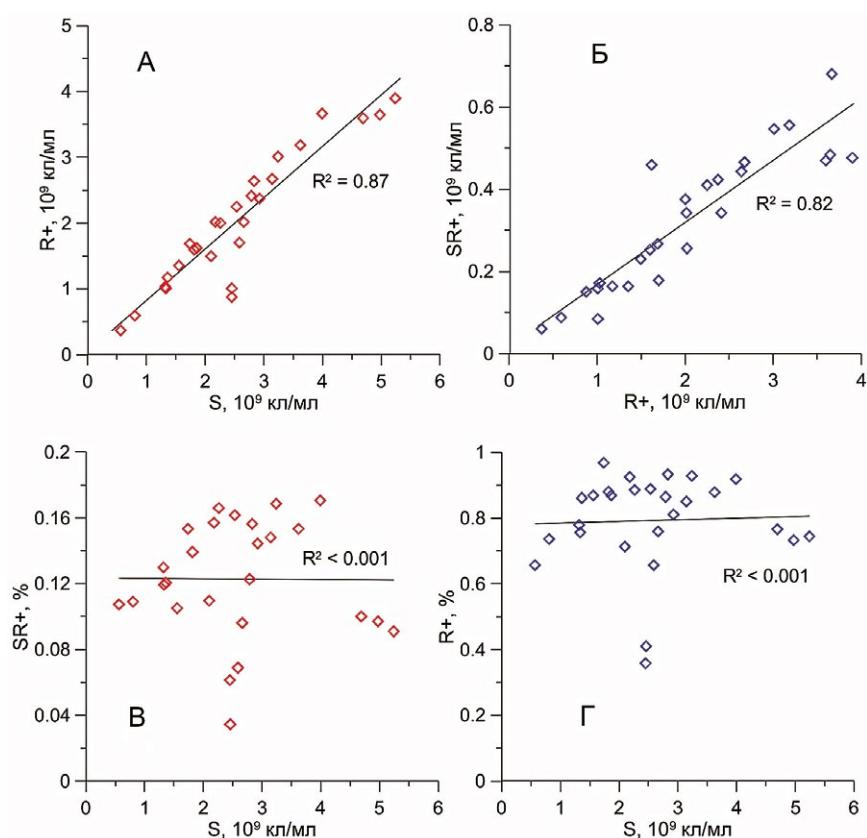
лее яркой флуоресценцией R123 – «суперокрашенных» сперматозоидов (SR+) составляла, в среднем,  $16,2 \pm 3,8\%$  от общего числа окрашенных родамином (R+) сперматозоидов, варьируя от 8,4 до 28,4%. Цитометрические оценки размеров сперматозоидов группы SR+ ( $ESD = 2,35 \pm 0,02$  мкм) оказались достоверно ( $P < 0,05$ ) выше средней ESD ( $2,23 \pm 0,03$  мкм) сперматозоидов в совокупной группы окрашенных родамином (R+). –

Проведённый анализ не выявил значимой связи между биологическими характеристиками самцов и цитометрическими характеристиками их спермы (рис. 2). Концентрация сперматозоидов в разных образцах спермы (S) не зависела ни от размеров (длины, TL, см) (рис. 2 А1), ни от веса (W, кг) (рис. 2 Б1) рыбы или от веса её гонад (Wg, г) (рис. 2 В1), однако показала незначительную обратно пропорциональную зависимость от коэффициента упитанности рыбы F (рис. 2 Г1). Доля окрашенных R123 сперматозоидов (R+, %)

в сперме калкана также не зависела ни от одного из биологических показателей: длины, TL, см (рис. 2 А2), веса W, кг (рис. 2 Б2), веса гонад Wg, г (рис. 2 В2), коэффициента упитанности F (рис. 2 Г2).

Общая доля окрашенных сперматозоидов (R+) коррелировала с общей концентрацией сперматозоидов (S) в сперме (рис. 3 А), также как и доля суперокрашенных родамином (SR+) с совокупной долей окрашенных родамином (R+) сперматозоидов (рис. 3 Б) с высокими коэффициентами детерминации  $R^2$  (0,87 и 0,82, соответственно). Напротив, ни доля суперокрашенных (SR+), ни совокупность окрашенных сперматозоидов (R+) не коррелировали с общей концентрацией сперматозоидов в сперме калкана (рис. 3 В и 3 Г).

Вариации концентрации сперматозоидов (S) в сперме черноморского калкана из природных популяций, полученные с помощью цитометрического анализа ( $0,6 - 5 \times 10^9$  кл мл<sup>-1</sup>), составили, в среднем, для



**Рис. 3.** Зависимости: (А) – доли окрашенных родамином 123 сперматозоидов (R+) от общей концентрации сперматозоидов в сперме калкана (S); (Б) – доли суперокрашенных (SR+) от совокупной доли окрашенных родамином 123 (R+); (В) – доли суперокрашенных (SR+) и (Г) – совокупной доли окрашенных сперматозоидов (R+) от общей концентрации сперматозоидов в сперме (S+)

**Fig. 3.** Relationships between: (A) – proportion of rhodamine 123-stained spermatozoa (R+) and total concentration of spermatozoa in turbot sperm (S); (B) – proportion of super-stained spermatozoa (SR+) and total proportion of rhodamine 123-stained spermatozoa (R+); (B) – proportion of super-stained spermatozoa (SR+) and (Г) – total proportion of stained spermatozoa (R+) relative to the total concentration of spermatozoa in sperm (S+)

всех изученных проб  $2,8 \times 10^9$  кл мл<sup>-1</sup>. Эти показатели оказались сопоставимы со значениями концентрации спермы калкана из того же региона, определёнными с помощью прямого счёта в камере Горяева [Baianina et al., 2022], что позволяет нам говорить о сходимости данных методов подсчёта концентрации. У половозрелых самцов культивируемого калкана в турецком экспериментальном питомнике концентрация сперматозоидов в сперме была достоверно ниже –  $1,98 \pm 0,30 \times 10^9$  кл мл<sup>-1</sup> [Polat et al., 2023], что, возможно, связано с тем, что в экспериментальных условиях аквакультуры, рыбы более подвержены стрессу, и условия их созревания и питания не полностью соответствуют условиям для оптимального процесса сперматогенеза.

Усреднённые размерные характеристики (ESD, мкм) сперматозоидов калкана, определённые нами с помощью проточной цитометрии ( $2,23 \pm 0,03$  мкм), были сравнимы с размерными характеристиками сперматозоидов балтийского тюббо, определёнными с помощью микроскопических измерений, варьирующими от  $2,10 \pm 0,03$  до  $2,3 \pm 0,04$  мкм для разных локаций Балтики [Gosz et al., 2010]. Размерные характеристики сперматозоидов тюббо из французских аквакультурных питомников варьировали в более широких пределах  $2,2 \pm 0,3$  мкм –  $2,9 \pm 0,3$  мкм) [Dreanno et al., 1999].

## ОБСУЖДЕНИЕ

Долю/процент сперматозоидов, окрашиваемых R123, можно интерпретировать как долю сперматозоидов с функциональными митохондриями в составе общей совокупности сперматозоидов [Barbagallo et al., 2020]. Поскольку R123 накапливается митохондриями в ответ на электрохимический градиент, создаваемый потенциалом митохондриальной мембранны, его поглощение чувствительно к таким факторам, как уровень калия или ионов водорода, которые непосредственно снижают потенциал митохондриальной мембранны, и, соответственно, с помощью метода можно достаточно точно оценивать уровень мембрально-опосредованных повреждений.

Полученные нами данные указывают на изменчивость состава спермы (концентрации и соотношения групп сперматозоидов с разной активностью, их размеров и значений МПМ, окрашенных родамином), варьирующих, по-видимому, в зависимости от индивидуальной генетики и физиологического состояния конкретного организма. Совокупность факторов может влиять как на запасы АТФ в сперматозоидах, так и на состояние и состав мембран сперматозоидов. Известно, что, помимо различий между составом спермы разных индивидуумов, в любом образце индивидуальной спермы могут присутствовать гетеро-

генные кластеры сперматозоидов [Holt et al., 2004]. Существование кластеров более активных сперматозоидов (SR+) в общей совокупности сперматозоидов спермы разных самцов калкана, может обуславливать повышение конкурентоспособности спермы в разнообразных условиях среды. Физиологические характеристики сперматозоидов кластера SR+ остаются пока не выясненными, однако, по-видимому, они образуют наиболее активную фракцию спермы.

Подвижность сперматозоидов у р. *Scophthalmus* безусловно зависит, главным образом, от эндогенного содержания АТФ, накопленного заранее в митохондриях сперматозоидов, и основная часть кatabолизма АТФ связана с динеин-АТФ-азой, в противоположность другим рыбам, а не с АТФ, полученной в процессе митохондриальной фосфорилиации в течение подвижной фазы. В интактной сперме рыб р. *Scophthalmus* 90% аденоzinовых нуклеотидов находятся в наиболее высокоэнергетической форме – АТФ с внутриклеточным содержанием в пределах 17-23 нмоль 10<sup>-8</sup> сп.<sup>-1</sup> в исходно неподвижном сперматозоиде тюббо в неактивированной сперме [Dreanno et al., 1998]. Однако, известно, что часть дополнительной, необходимой для более длительного движения сперматозоидов, энергии, поступает в результате анаэробной ферментации и окислительного фосфорилирования [Dreanno et al., 2000], и вырабатывается в процессе движения сперматозоида за счёт высокой эффективности митохондриального окислительного фосфорилирования / митохондриальной активности [Dreanno et al., 1999]. Во время периода «перезагрузки», проходящей, предположительно, в результате дыхательной активности митохондрий [Cosson et al., 2008], в процессе движения сперматозоида за счёт высокой эффективности митохондриального окислительного фосфорилирования / митохондриальной активности сперматозоиды рыб р. *Scophthalmus* восстанавливают практически исходный уровень АТФ клетки [Dreanno et al., 1998]. Эти особенности метаболизма сперматозоидов калкана поясняют важность функциональности их митохондрий для жизнеспособности и длительности движения сперматозоидов.

Особенность спермы камбалы калкан, выделяющая её среди спермы не только пресноводных, но и других морских рыб, характеризуется также присутствием в её липидном составе значительного количества фосфолипидов, с доминированием фосфатидилхолина, имеющего высокое сродство с мембранами. В составе фосфатидилэтаноламина спермы калкана обнаружено высокое содержание ненасыщенной жирной докозагексаеновой кислоты (ДГК) 22:6n-3 (до 21,6%) [Drokin, 1993], обеспечивающей высокую

проницаемость мембран. Вариабельность ДГК в сперме калкана, связанная с метаболизмом и стрессом, может влиять на состояние МПМ, определяемое с помощью данного метода. Индивидуальные различия в соотношении эссенциальных компонентов, особенно полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) в составе спермы калкана, могут влиять на механизмы осморегуляции сперматозоидов, и, соответственно, на их подвижность. Например, известно, что добавка витамина Е в пище приводила к увеличению содержания ПНЖК и, как следствие, к улучшению качества спермы (концентрации, подвижности и морфологии сперматозоидов) тюрбо [Xu et al., 2015].

Первые пробные эксперименты по кратковременному замораживанию спермы черноморского калкана и успешному искусственному оплодотворению икры спермой после её заморозки и оттаивания показали возможность сохранения жизнеспособности спермы калкана после замораживания. Несмотря на снижение активности спермы после экспериментальной криоконсервации (с 80% у нативной до 60% у размороженной), развитие икры калкана после её оплодотворения размороженной спермой, проходило без аномалий [Копейка и др., 1987]. Проточный цитометрический анализ спермы близкородственного калкану тюрбо *Scophthalmus maximus* после её замораживания выявил до 93% (в среднем 80%) неповреждённых плазматических мембран и митохондрий сперматозоидов [Ogier De Baulny et al., 1997], и нормальную дыхательную активность митохондрий [Dreanno et al., 1997]. Криоконсервация спермы тюрбо для целей аквакультуры показала возможность использования её после разморозки для оплодотворения икры с результатами процента оплодотворения (и, впоследствии, вылуплением личинок), сопоставимыми с таковыми при использовании свежей спермы [Chen et al., 2004].

Отсутствие значимой связи/корреляции между цитометрическими характеристиками сперматозоидов с биологическими показателями самцов калкана, по-видимому, свидетельствует о том, что, несмотря на различия в длине и весе (от 47 до 55,5 см и весом от 1,8 до 2,8 кг) рыб, образцы спермы принадлежали к достаточно однородной группе половозрелых самцов из одной нерестовой популяции, находящейся в сходных экологических и трофических условиях. Аналогично, ранее не было обнаружено значимой корреляции между различиями в морфологических характеристиках сперматозоидов и характеристиками самцов (длина, объём сперматозоидов, масса гонад, гонадосоматический индекс) у балтийского тюрбо [Gosz et al., 2010]; также как и между характеристи-

ками спермы и весом, и возрастом самцов атлантического тюрбо (в диапазоне веса 1,4–3,2 кг) из европейских аквакультурных ферм [Suquet et al., 1994]. Индивидуальные различия характеристик спермы, безусловно, отражают комбинированные взаимодействия между генетическими характеристиками и физиологическим состоянием самцов, помимо влияния многочисленных абиотических и биотических факторов [Kowalskj, Cejko, 2019].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработка эффективных методов оценки спермы необходима как для оценки состояния репродуктивных характеристик самцов черноморского калкана из естественных популяций, которые можно будет использовать для селекции лучших производителей как для создания маточных стад калкана и других видов ценных морских рыб для аквакультурной промышленности, так и для оценки состояния их сперматозоидов в процессе и после их криоконсервации. В перспективе для оценки интактной и криопрезервированной спермы при создании банка спермы самцов черноморского калкана в целях генетико-селекционных работ по данному виду, как это практикуется для атлантического тюрбо, может быть рекомендован модифицированный метод проточной цитометрии, результаты анализа которого показаны в данной работе.

Данную работу авторы начинали вместе с нашим коллегой и другом, к. б. н. **Виталием Евгеньевичем Гирагосовым**. В работе использованы данные по биологическим характеристикам самцов калкана из составленной им базы данных по популяциям черноморского калкана. Блестящий ихтиолог, В.Е. Гирагосов ушёл из жизни 20 февраля 2022 г. Мы благодарны ему за многолетнее успешное сотрудничество.

## Благодарности

Авторы благодарны неизвестным рецензентам за помощь и ценные рекомендации по улучшению статьи.

## Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Соблюдение этических норм

Все применимые этические нормы соблюdenы.

## Финансирование

Работа была выполнена в рамках государственных заданий ФИЦ ИнБЮМ по темам №№ гос. регистрации 124022400152-1 и 124030400057-4.

## ЛИТЕРАТУРА

- Воронина Е.П. 2010. К морфологии и систематике представителей семейства Scophthalmidae // Вопросы ихтиологии. Т. 50. № 6, с. 725-733. DOI: 10.1134/S00329452100090018.
- Гирагосов В.Е. 2020. Формирование и реализация плодовитости у черноморского калкана *Scophthalmus maeoticus* (Scophthalmidae) на юго-западном шельфе Крымского полуострова // Вопросы ихтиологии. Т. 60. № 4. С. 442-451. DOI:10.1134/S0032945220040050.
- Копейка Е.Ф., Чепурнов А.В., Дрокин С.И., Владимирицев В.Б., Александров Ю.Г. 1987. Низкотемпературная пресервация спермы черноморских рыб (*Psetta maeotica* Pallas) и бычка (*Neogobius melanostomus* Pallas) // Криобиология. № 4. С. 48-49.
- Марти Ю.Ю. 1939. Материалы к биологии черноморской камбалы-калкана (*Rhombus maeoticus* Pallas) // Сб. посвящ. науч. деятельности почетного члена АН СССР, засл. деятеля науки и техники Н.М. Книповича (1885-1939). М.: Изд-во АН СССР. С. 232-253.
- Павлов Д.А. 2006. Метод оценки качества спермы рыб // Вопр. ихтиологии. Т. 46. № 3. С. 384-392. DOI: 10.1134/S0032945206050055.
- Правдин И.Ф. 1966. Руководство по изучению рыб. М.: Пищ. пром-сть, 376 с.
- Baiandina I., Giragosov V., Khanaychenko A. 2022. Male reproductive potential in the Black Sea turbot (*Scophthalmus maximus*) spawning populations // Fisheries Research. V.253:106367. DOI: 10.1016/j.fishres.2022.106367.
- Barbagallo F., La Vignera S., Cannarella R., Aversa A., Calogero A.E., Condorelli R.A. 2020. Evaluation of sperm mitochondrial function: a key organelle for sperm motility // J. Clinical Medicine. V. 9. № 2. P. 363 (1-12). DOI:10.3390/jcm9020363.
- Bian X., Zhang X., Gao T., Wan R., Chen S., Sakurai Y. 2010. Morphology of unfertilized mature and fertilized developing marine pelagic eggs in four types of multiple spawning flounders // Ichthyological Research. V. 57. № 4. P. 343-357. DOI 10.1007/s10228-010-0167-1.
- Chanet B. 2003. Interrelationships of Scophthalmid fishes (Pleuronectiformes: Scophthalmidae) // Cybium. V 27. № 4. P. 275-286.
- Chen S.L., Ji X.S., Yu G.C., Tian, Y.S., Sha, Z.X. 2004. Cryopreservation of sperm from turbot (*Scophthalmus maximus*) and application to large-scale fertilization // Aquaculture. V.236. P. 547-556. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2003.10.027.
- Cosson J. 2004. The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa// Aquaculture International. V. 12. P.69-85. DOI:10.1023/B:AQUI.0000017189.44263.bc
- Cosson J., Graison A.-L., Suquet M., Fauvel C., Dreanno C., Billard R. 2008. Studying sperm motility in marine fish: an overview on the state of the art // J. Appl. Ichthyol. V. 24. № 4. P. 460-486. DOI: 10.3389/fmars.2019.00740.
- Dreanno C., Suquet M., Desbruyeres E., Cosson J., Le Delliou H., Billard R. 1998. Effect of urine on semen quality in turbot (*Psetta maxima*) // Aquaculture. V. 169. № 3-4. P. 247-262. DOI: 10.1016/S0044-8486(98)00262-2.
- Dreanno C., Cosson J., Suquet M., Seguin F., Dorange G., Billard R 1999. Nucleotide content, oxydative phosphorylation, morphology, and fertilizing capacity of turbot (*Psetta maxima*) spermatozoa during the motility period // Molecular reproduction and development: incorporating gamete research. V. 53. № 2. P. 230-243. DOI: 10.1002/(SICI)1098-2795(199906)53:2<230::AID-MRD12>3.0.CO;2-H.
- Dreanno C., Seguin F., Cosson J., Suquet M., Billard R. 2000. 1H-NMR and 31P-NMR analysis of energy metabolism of quiescent and motile turbot (*Psetta maxima*) spermatozoa // J. Experimental Zoology. V.286. № .5. P. 513-522. DOI: 10.1002/(SICI)1097-010X(20000401)286:5<513::AID-JEZ9>3.0.CO;2-5.
- Drokin S.I. 1993. Phospholipid distribution and fatty acid composition of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in sperm of some freshwater and marine species of fish // Aquatic Living Resources. V. 6. № 1. P. 49-56.
- Evanson D. P., Darzynkiewicz Z., Melamed M. R. 1982. Simultaneous measurement by flow cytometry of sperm cell viability and mitochondrial membrane potential related to cell motility // J. Histochem Cytochem. V. 30. № 3. P. 279-280. DOI: 10.1177/30,3,6174566.
- Giragosov V.E., Khanaychenko, A.N. 2012. The state-of-art of the Black Sea turbot spawning population off Crimea (1998-2010) // Turk. J. Fish. Aquatic Sciences. № 12 (Sp. Iss.). P. 377-383. DOI: 10.4194/1303-2712-v12\_2\_25. 9.
- Gosz E., Mirny Z., Horbowy J., Ziętara M.S. 2010. Morphometry of turbot spermatozoa in relation to the location and time of capture during the spawning season // J. Applied Ichthyology. V.26. № 5. P. 784-788. DOI: 10.1111/j.1439-0426.2010.01547.x
- Holt W. V., Van Look K.J.W. 2004. Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory tests of semen quality // Reproduction. V. 127. № 5. P. 52-535. DOI: 10.1530/rep.1.00134.
- Kowalski R. K., Cejko B. I. 2019. Sperm quality in fish: Determinants and affecting factors // Theriogenology. V. 135. P. 94-108. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2019.06.009.
- Liu Q. H., Li J., Zhang S. C., Xiao Z. Z., Ding F. H., Yu D. D., Xu X. Z. 2007. Flow cytometry and ultrastructure of cryopreserved red seabream (*Pagrus major*) sperm // Theriogenology. V.67. № 6. P. 1168-1174. DOI:10.1016/j.theriogenology.2006.12.013.
- Liu Y., Liu Q., Xu S., Wang Y., Feng C., Zhao C., Song Z., Li J. 2021. A deep insight of spermatogenesis and hormone levels of aquacultured turbot (*Scophthalmus maximus*) // Frontiers in Marine Science 7: 592880. DOI: 10.3389/fmars.2020.592880
- Ogier De Baulny O.B., Le Vern Y., Kerboeuf D., Maisse G. 1997. Flow cytometric evaluation of mitochondrial activity and membrane integrity in fresh and cryopreserved rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa // Cryobiology. V.34. № 2. P. 141-149. DOI: 10.1006/cryo.1996.1992.

- Paniagua-Chávez C.G., Jenkins J., Segovia M., Tiersch T.R. 2006. Assessment of gamete quality for the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) by use of fluorescent dyes // *Cryobiology*. V.53. № .1. P. 128-138. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2006.05.001.
- Polat H., Kurtoglu I.L. 2023. Effect of antioxidants on cryopreserved turbot (*Scophthalmus maximus*) spermatozoa quality and DNA damage // *Turk. J. Fish. Aquat. Sci.* V. 23. № 4, TRJFAS22300 DOI: 10.4194/TRJFAS22300.
- Segovia M., Jenkins J.A., Paniagua-Chavez C., Tiersch T.R. 2000. Flow cytometric evaluation of antibiotic effects on viability and mitochondrial function of refrigerated spermatozoa of Nile tilapia // *Theriogenology*. V. 53. № 7. P. 1489-1499. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2006.05.001.
- Suquet M., Billard R., Cosson J., Dorange G., Chauvaud L., Mugnier C., Fauvel C. 1994. Sperm features in turbot (*Scophthalmus maximus*): a comparison with other freshwater and marine fish species // *Aquatic Living Resources*. V. 7. № 4. P. 283-294. DOI: 10.1051/alar:1994031.
- Turan C., Ivanova P.P., Raykov V.S., Gurlek M., Erguden D. et al. 2019. Genetics structure analysis of turbot (*Scophthalmus maximus*, Linnaeus, 1758) in the Black and Mediterranean Seas for application of innovative management strategies // *Frontiers in Marine Science*. V. 6. Art. № . 740. P. 1-9. DOI: 10.3389/fmars.2019.00740.
- Xu H., Huang L., Liang M., Zheng K., Wang X. 2015. Effect of dietary vitamin E on the sperm quality of turbot (*Scophthalmus maximus*) // *J. Ocean University of China*. V.14. P.695-702. DOI 10.1007/s11802-015-2555-7.
- REFERENCES**
- Voronina E.P. 2010. On morphology and taxonomy of Scophthalmidae // *J. Ichthyol.* V. 50. No. 9. P. 695-703. DOI: 10.1134/S00329452100090018. (In Russ.).
- Giragosov V.E. 2020. Forming and realization of fecundity in the Black Sea turbot *Scophthalmus maeoticus* (Scophthalmidae) at the South-Western shelf of the Crimean Peninsula // *J. Ichthyol.* V. 60. No 4. P. 608-617. DOI:10.1134/S0032945220040050. (In Russ.).
- Kopeika E.F., Chepurnov A.V., Drokin S.I., Vladimirtsev V.B., Alexandrov Yu.G. 1987. Low temperature preservation of sperm of the Black Sea fish *Psetta maeotica* Pallas and bullhead *Neogobius melanostomus* Pallas // *Kriobiologiya* № 4. P. 48-49 (In Russ.).
- Marti Yu.Yu. 1939. Materials on the biology of the flatfish *Rhombus maeoticus* Pallas in the Black Sea // Col. of scientific articles in honour of scientific activity of N.M. Knipovich (1885-1939). U.R.S.S. Acad. of Sci. Pub. House, Moscow: 232-253. (in Russ.)
- Pavlov D.A. 2006. A method for the assessment of sperm quality in fish // *Journal of Ichthyology*. V. 46. P. 391-398. DOI: 10.1134/S0032945206050055. (In Russ.).
- Pravdin I.F. 1966. Guide to the Fish Study. M.: Food industry, 376 p. (In Russ.).
- Baiandina I., Giragosov V., Khanaychenko A. 2022. Male reproductive potential in the Black Sea turbot (*Scophthalmus maximus*) spawning populations // *Fisheries Research*. V.253:106367. DOI: 10.1016/j.fishres.2022.106367
- Barbagallo F., La Vignera S., Cannarella R., Aversa A., Calogero A.E., Condorelli R.A. 2020. Evaluation of sperm mitochondrial function: a key organelle for sperm motility // *J. Clinical Medicine*. V.9. № 2. P. 363 (1-12). DOI:10.3390/jcm9020363.
- Bian X., Zhang X., Gao T., Wan R., Chen S., Sakurai Y. 2010. Morphology of unfertilized mature and fertilized developing marine pelagic eggs in four types of multiple spawning flounders // *Ichthyological Research*. V. 57. № 4. P. 343-357. DOI 10.1007/s10228-010-0167-1.
- Chanet B. 2003. Interrelationships of Scophthalmid fishes (Pleuronectiformes: Scophthalmidae) // *Cybium*. V 27. № 4. P. 275-286.
- Chen S.L., Ji X.S., Yu G.C., Tian, Y. S., Sha, Z. X. 2004. Cryopreservation of sperm from turbot (*Scophthalmus maximus*) and application to large-scale fertilization // *Aquaculture*. V.236. P. 547-556. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2003.10.027.
- Cosson J. 2004. The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa// *Aquaculture International*. V. 12. P. 69-85. DOI:10.1023/B:AQUI.0000017189.44263.bc
- Cosson J., Groison A.-L., Suquet M., Fauvel C., Dreanno C., Billard R. 2008. Studying sperm motility in marine fish: an overview on the state of the art // *J. Appl. Ichthyol.* V. 24. № 4. P. 460-486. DOI: 10.3389/fmars.2019.00740.
- Dreanno C., Suquet M., Desbruyeres E., Cosson J., Le Delliou H., Billard R. 1998. Effect of urine on semen quality in turbot (*Psetta maxima*) // *Aquaculture*. V. 169. № 3-4. P. 247-262. DOI: 10.1016/S0044-8486(98)00262-2.
- Dreanno C., Cosson J., Suquet M., Seguin F., Dorange G., Billard R 1999. Nucleotide content, oxydative phosphorylation, morphology, and fertilizing capacity of turbot (*Psetta maxima*) spermatozoa during the motility period // *Molecular reproduction and development: incorporating gamete research*. V. 53. № .2. P. 230-243. DOI: 10.1002/(SICI)1098-2795(199906)53:2<230::AID-MRD12>3.0.CO;2-H.
- Dreanno C., Seguin F., Cosson J., Suquet M., Billard R. 2000. 1H-NMR and 31P-NMR analysis of energy metabolism of quiescent and motile turbot (*Psetta maxima*) spermatozoa // *J. Experimental Zoology*. V. 286. № 5. P. 513-522. DOI: 10.1002/(SICI)1097-010X(20000401)286:5<513::AID-JEZ9>3.0.CO;2-5/
- Drokin S.I. 1993. Phospholipid distribution and fatty acid composition of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in sperm of some freshwater and marine species of fish // *Aquatic Living Resources*. V. 6. № 1. P. 49-56.
- Evenson D. P., Darzynkiewicz Z., Melamed M. R. 1982. Simultaneous measurement by flow cytometry of sperm cell viability and mitochondrial membrane potential related to cell motility // *J. Histochem Cytochem*. V. 30. № 3. P. 279-280. DOI: 10.1177/30,3,6174566.
- Giragosov V.E., Khanaychenko, A.N. 2012. The state-of-art of the Black Sea turbot spawning population off Crimea (1998-2010) // *Turk. J. Fish. Aquatic Sciences*. № 12 (Sp. Iss.). P. 377-383. DOI: 10.4194/1303-2712-v12\_2\_25. 9.

- Gosz E., Mirny Z., Horbowy J., Ziętara M.S. 2010. Morphometry of turbot spermatozoa in relation to the location and time of capture during the spawning season // *J. Applied Ichthyology*. V.26. № 5. P. 784-788. DOI: 10.1111/j.1439-0426.2010.01547.x
- Holt W. V., Van Look K.J.W. 2004. Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory tests of semen quality // *Reproduction*. V. 127. № 5. P. 52-535. DOI: 10.1530/rep.1.00134
- Kowalski R.K., Cejko B.I. 2019. Sperm quality in fish: Determinants and affecting factors // *Theriogenology*. V. 135. P. 94-108. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2019.06.009.
- Liu Q.H., Li J., Zhang S.C., Xiao Z.Z., Ding F.H., Yu D.D., Xu X.Z. 2007. Flow cytometry and ultrastructure of cryopreserved red seabream (*Pagrus major*) sperm // *Theriogenology*. V.67. № 6. P. 1168-1174. DOI:10.1016/j.theriogenology.2006.12.013.
- Liu Y., Liu Q., Xu S., Wang Y., Feng C., Zhao C., Song Z., Li J. 2021. A deep insight of spermatogenesis and hormone levels of aquacultured turbot (*Scophthalmus maximus*) // *Frontiers in Marine Science* 7: 592880. DOI: 10.3389/fmars.2020.592880.
- Ogier De Baulny O.B., Le Vern Y., Kerboeuf D., Maisse G. 1997. Flow cytometric evaluation of mitochondrial activity and membrane integrity in fresh and cryopreserved rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa // *Cryobiology*. V.34. № 2. P. 141-149. DOI: 10.1006/cryo.1996.1992
- Paniagua-Chávez C.G., Jenkins J., Segovia M., Tiersch T.R. 2006. Assessment of gamete quality for the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) by use of fluorescent dyes // *Cryobiology*. V.53. № .1. P. 128-138. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2006.05.001
- Polat H., Kurtoglu I.L. 2023. Effect of antioxidants on cryopreserved turbot (*Scophthalmus maximus*) spermatozoa quality and DNA damage // *Turk. J. Fish. Aquat. Sci.* V. 23. № 4, TRJFAS22300 DOI: 10.4194/TRJFAS22300
- Segovia M., Jenkins J.A., Paniagua-Chavez C., Tiersch T.R. 2000. Flow cytometric evaluation of antibiotic effects on viability and mitochondrial function of refrigerated spermatozoa of Nile tilapia // *Theriogenology*. V. 53. № 7. P. 1489-1499. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2006.05.001
- Suquet M., Billard R., Cosson J., Dorange G., Chauvaud L., Mugnier C., Fauvel C. 1994. Sperm features in turbot (*Scophthalmus maximus*): a comparison with other freshwater and marine fish species // *Aquatic Living Resources*. V. 7. № 4. P. 283-294. DOI: 10.1051/alr:1994031
- Turan C., Ivanova P.P., Raykov V.S., Gurlek M., Erguden D. et al. 2019. Genetics structure analysis of turbot (*Scophthalmus maximus*, Linnaeus, 1758) in the Black and Mediterranean Seas for application of innovative management strategies // *Frontiers in Marine Science*. V. 6. Art. № . 740. P. 1-9. DOI: 10.3389/fmars.2019.00740
- Xu H., Huang L., Liang M., Zheng K., Wang X. 2015. Effect of dietary vitamin E on the sperm quality of turbot (*Scophthalmus maximus*) // *J. Ocean University of China*. V.14. P. 695-702. DOI 10.1007/s11802-015-2555-7

Поступила в редакцию 04.02.2025 г.  
Принята после рецензии 26.02.2025 г.