

UNIwersytet WarMińsko-Mazurski w Olsztynie

Wydział Bioinżynierii Zwierząt



Dziedzina: nauki rolnicze

Dyscyplina: zootechnika i rybactwo

mgr Agnieszka Eliza Sikora

nr albumu: 1035

**Wpływ wybranych antagonistów dopaminy na rozród i odporność
samic karasia pospolitego (*Carassius carassius* L.)**

*Praca doktorska wykonana
w Katedrze Ichtiologii i Akwakultury
pod kierunkiem
prof. dr hab. inż. Krystyny Demskiej-Zakęś
oraz dra inż. Daniela Źarskiego*

Olsztyn, 2020

Streszczenie

Wpływ wybranych antagonistów dopaminy na rozród i odporność samic karasia pospolitego (*Carassius carassius* L.)

Zwiększenie podaży ryb i produktów rybnych w dużej mierze uwarunkowane jest rozwojem technik kontrolowanego rozrodu. W tej formie rozrodu bardzo często stosowane są preparaty farmakologiczne, które umożliwiają synchronizację tarła, poprawiają jakość gamet i minimalizują dysfunkcje wynikające ze stresu. W praktyce do indukowania dojrzewania gamet, owulacji i spermacji stosowane są różne preparaty, w tym gonadoliberyny (GnRH). Jednakże, u wielu gatunków ryb, zwłaszcza karpiowatych (Cyprinidae), wprowadzenie do organizmu egzogennej gonadoliberyny powoduje wzmożone wydzielanie dopaminy, która negatywnie wpływa na uwalnianie GnRH i gonadotropin (GtH). To niekorzystne działanie można zniwelować poprzez podanie preparatów blokujących receptory dopaminowe. Takie właściwości wykazują antagoniści receptorów dopaminy (DA), co tłumaczy wzrost zainteresowania preparatami DA pod kątem możliwości ich wykorzystania, samodzielnie lub z GnRH, do indukowania rozrodu ryb. Należy jednak podkreślić, że badania tego typu są nieliczne, a wyniki niekompletne i niejednoznaczne. Konieczność pogłębienia wiedzy na temat wpływu DA na ryby, a także potencjalne perspektywy poprawienia dobrostanu tarlaków (właściwości uspokajające DA) i zwiększenia efektywności produkcji materiału zarybieniowego i/lub obsadowego stały się inspiracją do podjęcia prezentowanych badań. Przeprowadzono je na karasiu pospolitym (*Carassius carassius* L.), jak dotąd jedynym gatunku, u którego po zastosowaniu wyłącznie metoklopramid odnotowano owulację i pozyskano wysokiej jakości gamety.

Celem prezentowanych badań było określenie wpływu komercyjnych preparatów opartych na analogach gonadoliberyny i antagonistach receptorów dopaminy (Ovopelu: mGnRHa + metoklopramid i Ovaprimu: sGnRH + domperidon) oraz preparatów zawierających wyłącznie DA (Metoklopramid i Domperidonu) na: funkcjonowanie osi podwzgórze - przysadka mózgowa – gonady (HPG) i proces finalnego dojrzewania oocytów, a także poziom kortyzolu, wybranych wskaźników biochemicznych i hematologicznych, wybuchu tlenowego i aktywności fagocytarnej jako markerów stresu i odporności u samic karasia pospolitego.

Dojrzałe płciowo samice karasia (n=60) pozyskano w okresie przedtarłowym z Ośrodka Zarybieniowego „Żurawia” (Biała Rawska, Polska). Funkcjonowanie osi HPG określono poprzez zbadanie ekspresji genów kodujących GnRH w mózgu oraz genów kodujących hormony: luteinizujący (LH) i folikulotropowy (FSH) w przysadce mózgowej, odpowiednio geny *cgnrh-II* oraz *lhβ* i *fshβ*, a także oszacowanie poziomu hormonów w plazmie krwi: LH i FSH, 17β-estradiolu (E) oraz 17α20β-dihydroksyprogesteronu (17α20β-DPH). Wpływ testowanych preparatów na proces dojrzewania oocytów oceniano mikroskopowo, wykorzystując metodę do przyżyciowego określania stopnia dojrzałości samic ryb karpiowatych.

Do oceny wpływu Ovopelu, Metoklopramidu, Ovaprimu i Domperidonu na poziom stresu i odporność samic wykorzystano dane uzyskane w badaniach *in vivo* i *in vitro*. W badaniach *in vivo* zbadano poziom kortyzolu w plazmie krwi, oznaczono i analizowano wartości parametrów biochemicznych krwi, m.in. poziom glukozy (GLU), białka całkowitego (TP), albumin (ALB), globulin (GLOB), bilirubiny (BIL), kreatyniny (CREA), amoniaku (NH₃), wybranych enzymów i jonów. Ponadto, określono wartości podstawowych wskaźników hematologicznych. W eksperymencie *in vitro* zbadano parametry wybuchu tlenowego, określono leukogram i aktywność fagocytarną.

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że testowane preparaty farmakologiczne tj., Ovopel, Ovaprim, Metoklopramid i Domperidon miały ograniczony wpływ na funkcjonowanie osi HPG. Nie stwierdzono bowiem ich oddziaływania na ekspresję genu kodującego gonadoliberynę (gen *cgnrh-II*), genów kodujących gonadotropiny (geny *lhβ* i *fshβ*) oraz stężenia FSH i LH w plazmie krwi ($p > 0,05$). Trzeba jednak dodać, że występowały istotne różnice między grupami stymulowanymi Ovopelem (grupa OM) i Ovaprimem (grupa OD) w poziomie ekspresji genów *cgnrh-II* i *fshβ* oraz między grupą OM i grupą samic, którym podano Domperidon (grupa D) w przypadku genu *fshβ*. Zastosowane preparaty miały wpływ na poziom estradiolu i 17α20β-dihydroksyprogesteronu. W porównaniu do grupy kontrolnej (grupa K), istotnie wyższe stężenie E stwierdzono w grupie OM, natomiast wzrost 17α20β-DHP odnotowano w grupie OD. Adekwatnie do poziomu tych hormonów prezentowały się wyniki analiz dojrzewania oocytów. W odniesieniu do grupy kontrolnej znacząco wyższy stopień dojrzałości oocytów występował po iniekcji preparatami zawierającymi GnRH_a i DA.

Analizując wyniki pomiaru stężenia kortyzolu we wszystkich grupach ryb stwierdzono podwyższony poziom tego hormonu w plazmie krwi. Nie wykazano natomiast zależności

między rodzajem zastosowanego preparatu farmakologicznego a stężeniem kortyzolu. Również zmiany parametrów biochemicznych pod wpływem testowanych preparatów były niewielkie. Dotyczyły one stężenia amoniaku (grupa K vs grupy M i D), kreatyniny (grupa K vs grupa OM), jonów potasu (grupa K vs grupy OD i D) oraz stosunku Na^+/K^+ (grupa K vs grupa D). Spośród analizowanych wskaźników hematologicznych jedynie Metoklopramid spowodował zmiany w morfologii krwi, a konkretnie wzrost wartości RBC. Zdecydowanie wyraźniej manifestował się wpływ testowanych preparatów na poziom wybuchu tlenowego i aktywność fagocytarną. Wybuch tlenowy najszybciej narastał w grupie eksponowanej na Metoklopramid, osiągając przy tym najwyższą wartość ($p \leq 0,05$). Ten preparat spowodował również istotny wzrost indeksu fagocytarnego (IF), względnego udziału komórek fagocytujących (PhC) i średniej aktywności biobójczej fagocytów (MCA). Natomiast po zastosowaniu Ovopelu wartość maksymalna wybuchu tlenowego (PIK) oraz wartości IF i PhC były istotnie niższe w porównaniu z grupą kontrolną. Ekspozycja na Ovaprim lub Domperidon skutkowała wzrostem poziomu IF i MCA.

Reasumując, podawanie samicom karasia pospolitego wyłącznie antagonistów receptorów dopaminy nie pobudzało osi HPG i nie wpływało na dojrzewanie oocytów w sposób równie efektywny, jak Ovopel czy Ovaprim. Przeprowadzone badania i analizy poziomu kortyzolu oraz wskaźników biochemicznych i hematologicznych wykazały, że testowane preparaty nie miały wpływu na poziom stresu u samic karasia pospolitego. Natomiast wyniki badań *in vitro* wyraźnie wskazują, że Metoklopramid stymulował układ odpornościowy samic karasia pospolitego, natomiast Ovopel działał supresyjnie.

Słowa kluczowe: antagonisty receptorów dopaminy, dojrzewanie oocytów, karaś pospolity, odporność, oś podwzgórzowo-przysadkowo-gonadowa, stres

Summary

Effect of selected dopamine antagonists on reproduction and immunity of crucian carp females (*Carassius carassius* L.)

Increasing the supply of aquaculture products is largely determined by the development of controlled fish reproduction techniques. Controlled reproduction is usually done with the use of pharmacological preparations, which enable synchronization of spawning, improve the quality of gametes and minimize fish dysfunction resulting from stress. In practice, various preparations, including gonadoliberin (GnRH), are used to induce gamete maturation, ovulation and spermiation. However, in many species of fish, especially cyprinids (Cyprinidae), administration of exogenous gonadoliberin is followed by increased dopamine secretion. Dopamine reduces the release of GnRH and gonadotropins (GtH). This unfavorable effect can be counteracted by administering dopamine receptor blockers. Such properties are demonstrated by dopamine receptor antagonists (DA). This explains the increased interest in DA preparations in terms of the possibility of using them, alone or with GnRH, to induce reproduction processes in fish. However, it should be emphasized that research in this area is scarce and the results are incomplete and inconclusive. The need to deepen the knowledge about DA action on fish, and the potential prospects for improving the welfare of spawners (DA's exhibit calming properties), and the increase of the efficiency of the production of stocking material became the inspiration to undertake the research. The research was conducted on a crucian carp (*Carassius carassius* L.), so far, the only species in which ovulation was recorded and high-quality gametes were obtained after the use of metoclopramide.

The aim of this study was to investigate and compare the effects of chosen commercial preparations containing both GnRH analogues and dopamine receptor antagonists (Ovopel: mGnRHa + metoclopramide and Ovaprim: sGnRH + domperidone), and DA's acting alone (Metoclopramide and Domperidone) on the hypothalamic-pituitary-gonads axis (HPG). Additionally, the research covered evaluation of oocyte maturation stages; cortisol level in blood plasma; selected biochemical and hematological indicators and the oxygen burst level and phagocytic activity of leukocytes as markers of stress and immunity level in females crucian carp.

Mature females of crucian carp (n=60) were acquired in the pre-spawning season, from the Fish Breeding Center "Żurawia" (Biała Rawska, Poland). The HPG axis was studied by determining the level of *cgnrh-II* gene expression in the brain and *lhβ* and *fshβ* genes expression in the pituitary gland, and levels of hormones in blood plasma: LH, FSH, 17β-estradiol (E) and 17α20β-dihydroxyprogesterone (17α20β-DHP). The impact of the tested preparations on the oocyte maturation was assessed under a microscope, using the *in vivo* method to determine the degree of maturity of female cyprinids.

In vivo and *in vitro* methods were used to evaluate the effects of Ovopel, Metoclopramide, Ovaprim and Domperidone on the stress level and immunity of crucian carp females. *In vivo* experiment included determination of cortisol level in the blood plasma and the values of blood biochemical parameters: glucose (GLU), total protein (TP), albumin (ALB), globulin (GLOB), bilirubin (BIL), creatinine (CREA), ammonia (NH₃). Selected enzymes and ions and basic hematological indices were also determined. Leukogram, phagocytic activity and the parameters of an oxygen burst were examined in an *in vitro* experiment.

Results of this study showed that the tested pharmacological preparations: Ovopel, Ovaprim, Metoclopramide and Domperidon, had a limited impact on the functioning of the HPG axis. Their impact on the gene expression: gonadoliberin (*cgnrh-II* gene) and gonadotropin (*lhβ* and *fshβ* genes), and FSH and LH plasma concentrations was not found (p > 0,05). There were significant differences between the Ovopel (OM group) and Ovaprim (OD group) groups in the gene expression level of the *cgnrh-II* and *fshβ*, and between the OM group and the group of females administered Domperidone (group D) for the *fshβ* gene expression. The applied preparations changed the level of estradiol and 17α20β-dihydroxyprogesterone in blood plasma. Compared to the control group (group K), significantly higher concentrations of E were found in the OM group, while an increase in 17α20β-DHP was noted in the OD group. The results of oocyte maturation analysis were similar to the level of hormones (E and 17α20β-DHP). In relation to the control group, a significantly higher degree of oocyte maturity was observed after injection with preparations containing GnRH_a and DA.

The concentration of cortisol in blood plasma was elevated in all groups. There was no difference between the type of pharmacological preparation used and the concentration of cortisol in blood plasma. Few biochemical parameters showed changes after administration of tested preparations. Differences were found in the concentration of ammonia (group K vs

groups M and D), creatinine (group K vs groups OM), potassium ions (group K vs groups OD and D) and the ratio of Na^+/K^+ (group K vs group D). From the analyzed hematological indicators, only Metoclopramide caused changes in blood counts, namely an increase in RBC values. The effect of the tested preparations on the level of oxygen burst and phagocytic activity was much clearly seen. The oxygen burst grew most rapidly in the group exposed to Metoclopramide, reaching the highest value among all tested variants ($p \leq 0.05$). Moreover, Metoclopramide caused a significant increase in the phagocytic activity of leukocytes (IF), relative proportion of phagocytic cells (PhC) and the mean cidal activity (MCA). Contrary, the maximum value of oxygen burst (PIK) as well as IF and PhC values were significantly lower compared to the control group following Ovopel exposure. Exposure to Ovaprim or Domperidone resulted in increases in IF and MCA levels.

Concluding, dopamine receptor antagonists administered alone to female crucian carp did not stimulate the HPG axis and did not affect oocyte maturation as effectively as Ovopel or Ovaprim. The cortisol level analyses as well as hematological and biochemical indices showed that the tested preparations had no effect on the stress level in female crucian carp. In contrast, the results of *in vitro* studies clearly shows that Metoclopramide itself stimulates the immune system of female crucian carp, while Ovopel has a suppressive effect.

Key words: dopamine receptor antagonist, oocyte maturation, crucian carp, immunity, hypothalamic-pituitary-gonads axis, stress