

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: Aktywność immunologiczna a sukces rozrodczy samców karpia (*Cyprinus carpio* L.)

2. Czas trwania projektu: 4 lata

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): infekcja pasożytnicza, konkurencja nasienia, jakość nasienia, sukces reprodukcyjny

4. Cel projektu (art. 3 ustawy) (wpisać odpowiednią kategorię z poniższych): A.

A. Badania podstawowe

B. Badania translacyjne lub stosowane

C. Badania mające na celu zachowanie gatunku

D. Badania z zakresu medycyny sądowej

E. Badania zapewniające poprawę dobrostanu zwierząt lub warunków chowu lub hodowli zwierząt gospodarskich

F. Badania w celu opracowania i produkcji produktów leczniczych, środków spożywczych, pasz lub innych substancji lub produktów, lub badań ich jakości, skuteczności lub bezpieczeństwa stosowania

G. Badania w celu ochrony środowiska naturalnego

H. Badania w celu kształcenia na poziomie szkolnictwa wyższego lub szkolenia w celu nabycia lub doskonalenia kompetencji zawodowych

5. OPIS PLANOWANEGO DOŚWIADCZENIA

Należy określić cel naukowy lub edukacyjny doświadczenia, w tym przewidywane szkody, jakie może ono spowodować u wykorzystywanych zwierząt, i korzyści, jakie przyniesie ono dla rozwoju nauki i dydaktyki. Maksymalnie 250 słów, tekst musi być zrozumiały dla niespecjalisty.

Przedmiotem badań jest zjawisko post-kopulacyjnej selekcji płciowej, w której główną rolę odgrywa interakcja na poziomie gamet, a w szczególności zjawisko konkurencji plemników i jakości nasienia samca. Autorzy zamierzają wyjaśnić, czy różnice we wrodzonej odporności są skorelowane ze specyficznymi parametrami nasienia karpia zwiększającymi lub zmniejszającymi jego konkurencyjność a w konsekwencji zdolność do zapłodnienia. Szczegółowym celem naszego projektu jest zdobycie wiedzy na temat związku między wrodzonymi różnicami osobniczymi w aktywności układu

immunologicznego a sukcesem rozrodczym samców karpia (*Cyprinus carpio* L.). Wynikiem niniejszych badań będzie weryfikacja hipotezy: samce karpia, cechujące się lepszą wrodzoną odpornością na patogeny, podczas infekcji w sposób bardziej efektywny kontrolują aktywację systemu immunologicznego, a przez to produkują lepszej jakości mlecz i w konsekwencji mają większe szanse na przekazanie swoich genów potomstwu. Zastosowanie modelu chorobowego, jakim jest zakażenie pasożytem krwi *Trypanoplasma borreli* powoduje aktywację systemu odpornościowego ryb. Z reguły ryby zakażone pasożytem *T. borreli* nie wykazują oznak cierpienia czy pogorszenia kondycji, jednak u wysoko zapasożonych osobników może wystąpić brak żerowania, anemia a niekiedy wysięk w jamie ciała.

Wyniki naszych badań dostarczą wiedzy na temat sukcesu rozrodczego *C. carpio* w powiązaniu z aktywnością układu immunologicznego. Poznanie w jakim stopniu organizmy chorobotwórcze, aktywując układ odpornościowy gospodarza, mogą wpływać na jego sukces rozrodczy pozwoli na zgłębienie immunologicznych aspektów przystosowawczych organizmów. Podjęcie przedstawionej tematyki badawczej przyczyni się to do lepszego zrozumienia wpływu układu odpornościowego na podstawowe funkcje życiowe wszystkich kręgowców, w tym człowieka, poszerzając wiedzę dotyczącą teorii selekcji płciowej. Przeprowadzenie badań na karpie jest uzasadnione ze względu na jego wartość użytkową, jako jednego z najważniejszych gatunków ryb hodowlanych.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

337 osobników karpia (<i>Cyprinus carpio</i>)

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Przygotowując projekt badawczy, sprawdziłam istniejącą wiedzę w zakresie objętym wnioskiem badawczym, w bazach danych: Reserchgate, PUBMED; Google Scholar, AGRICOLA; ScienceDirect; Web of Science(JCR).

¹ Przy wypełnianiu wzorować się na instrukcji wypełniania wniosku W1 punkt. 8

Wykorzystałam słowa kluczowe: immunocompetence, carp immunology, carp innate immunity, fertility, parasite and reproduction, trade-off, sperm and immunity

Na podstawie przeanalizowanej literatury stwierdzono, że projekt badań jest innowacyjny i w pełni zasadny. Zgodnie z teorią upośledzenia immunologicznego (Immunocompetence handicap hypothesis), samce posiadające sprawniejszy system immunologiczny powinni wykazywać wyższy sukces reprodukcyjny. W trakcie infekcji ograniczone zasoby energetyczne lokowane są w reakcje odpornościowe kosztem wzrostu, szaty godowej czy też jakości produkowanych plemników. Zatem tylko samce w dobrej kondycji zdrowotnej są w stanie inwestować energię w obu kierunkach. Jednak dane na temat wzajemnych relacji układu immunologicznego i biologicznej wartości nasienia są sprzeczne (Losdat et al., 2011; Figenschou et al., 2012; Liljedal et al., 2013; Kortet et al., 2003; Boonekamp et al., 2008). Karp jest przykładem gatunku, u którego nie obserwuje się szaty godowej czy innych charakterystycznych cech mających na celu uatrakcyjnić samca w oczach samicy. U tego typu gatunków bezpośredni wpływ samicy na wybór odpowiedniego samca do rozrodu na poziomie osobniczym jest bardzo ograniczony. W typowym tarle w zapłodnieniu ikry może uczestniczyć kilku (do kilkunastu) samców. Większe samce, częściej znajdując się bliżej samicy, uzyskują lepsze warunki zapłodnienia, co nie wyklucza z konkurencji mniejszych samców (tzw. samców pasożytów). W tego typu zachowaniu godowym sukces reprodukcyjny samca w dużej mierze będzie zależał od zdolności konkurencyjnej plemników i zjawiska ukrytego wyboru samicy. Można zakładać, że samce, które nie ponoszą kosztów energetycznych związanych z rywalizacją o względy samicy kierują zasoby energetyczne przede wszystkim w „produkcję” dobrej jakości konkurencyjnego nasienia. W związku z powyższym, różnice w funkcjonowaniu układu immunologicznego muszą mieć znaczący wpływ na jakość plemników, w tym na ich zdolności konkurencyjne. **Powodem podjęcia przedstawionej tu tematyki badawczej jest brak danych dotyczących wpływu aktywności układu immunologicznego na sukces rozrodczy samców *C. carpio* oraz sprzeczne dane dotyczące specyficznego „zachowania” układu immunologicznego u tych ryb (Saha et al., 2002; Huttenhuis et al., 2006; Rohlenova et al., 2011; Buchtikova et al., 2011).**

Wyniki realizowanych badań dostarczą wiedzy na temat sukcesu rozrodczego *C. carpio* w powiązaniu z aktywnością układu immunologicznego. Dowiemy się, czy reakcja zapalna przechyli szalę na rzecz walki z patogenem i przetrwania jednostki czy raczej na rzecz sukcesu reprodukcyjnego i przedłużenia gatunku. **Będzie to również pierwszy eksperyment, w którym wykorzystamy karpie o precyzyjnie określonej aktywności immunologicznej.** Umożliwi to poznanie interakcji pomiędzy hormonalną

kontrolą spermatogenezy a układem immunologicznym. Wyjaśnienie wyżej wymienionych zagadnień ma istotne znaczenie w poznaniu roli post-kopulacyjnego doboru płciowego w wielu procesach ewolucyjnych, takich jak powstawanie gatunków (specjacje), lokalne adaptacje, utrzymanie zmienności genetycznej czy też koewolucja pasożyta i gospodarza.

Proponowane doświadczenie zostało zaprojektowane z myślą o efektywnej realizacji zasad zastąpienia, ograniczenia i udoskonalenia (tzw. zasada 3R – replacement, reduction and refinement).

Zasada zastąpienia: Przedmiotem badań są samce ryb charakteryzujące się przeprowadzaniem tarła grupowego, zatem aby osiągnąć założone w badaniach cele, czyli zbadanie związku pomiędzy sukcesem rozrodczym a sprawnością układu immunologicznego i hormonalnego, niemożliwe jest zastąpienie dojrzałych płciowo ryb ich larwami, hodowlami komórkowymi czy innymi organizmami.

Zasada zredukowania: Badania zaprojektowano tak, aby do minimum ograniczyć liczbę ryb biorących udział w teście bez uszczerbku dla celów projektu. Wieloletnie doświadczenie w pracy z pasożytem *T.borrel*i wykazało, że w każdej, nawet jednorodnej genetycznie grupie karp, wyróżnia się różne stopnie zainfekowania (Jurecka et al., 2009). Zatem, liczba zakażonych ryb (62) wynika z potrzeby posiadania odpowiednio dużej puli ryb, z których będzie można wyodrębnić skrajnie słabo oraz mocno zapasożyczone osobniki, co pozwoli na uzyskanie miarodajnych wyników. Liczba osobników wykorzystanych w III etapie (32) wynika z konieczności pozyskania wystarczającej liczby powtórzeń (8 tarlisk, w których umieszczonych zostanie po 4 samce i 1 samica). Z uwagi na to, że rozród tych ryb odbędzie się w zmiennych warunkach naturalnych należy brać pod uwagę, że zastosowanie mniejszej liczby powtórzeń mogłoby negatywnie wpłynąć na wyniki eksperymentu.

Zasada udoskonalenia: W badaniu wybrany został model chorobowy i dawki zakażeniowe, który nie powodują bolesnych uszkodzeń ciała zwierząt. Niezbędne będzie zapewnienie rydom odpowiednich warunków bytowych w postaci niewysokiego zagęszczenia, stałego napowietrzania oraz optymalnej temperatury wody (ok. 20°C). Ryby odławiane będą przy pomocy przelotowych kasarów, co zapobiega uszkodzenia powłok ciała (np. ubytki łusek). Istotne w doświadczeniu jest, aby badane osobniki aktywnie pobierały pokarm oraz nie wykazywały oznak osłabienia mogącego zniechęcać ryby do tarła. Wybrany został środek znieczulający MS-222 (ester metylosulfonowy kwasu 3 aminobenzoowego), którego działanie, jak i sposób podania (zanurzenie ryb w roztworze) ogranicza potencjalny ból, cierpienie i dystres a zastosowana dawka (od 50 do 150 mg/l wody) zmniejsza potencjalne

niebezpieczeństwo dla zdrowia znieczulonych ryb (Gomułka, 2016). W przypadku, gdy stan zdrowia ryb będzie wskazywał na zbliżającą się śmierć, zostaną one uśmiercone poprzez zastosowanie środka znieczulającego MS-222 w dawce letalnej (wczesne i humanitarne zakończenie procedury).

Piśmiennictwo:

- Boonekamp J.J., Ros A.H.F., Verhulst S.**(2008) Immune activation suppresses plasma testosterone level: a meta-analysis. *Biol Lett.* 4, 741-744.
- Buchtíková S., Vetešniková Šimková A., Rohlenová K., Flajšhans M., Lojek A., Esa-Matti L., Hyršl P.** (2011) The seasonal changes in innate immunity of the common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture*. 2011, 318: 169-175. 10.1016/j.aquaculture.2011.05.013.
- Figenschou L. Folstad I., Rudolfsen G., Hanssen S.A., Kortet R., Skau P.A., Killie J.E., Oskam I.C., Strand H.**(2012) The relative effect of parasites and social status on sperm traits in arctic charr. *Behavioral Ecology*, doi: 10.1093/beheco/ars190.
- Gomułka, P.** 2016. Wpływ 2,6 diizopropyllofenolu na wybrane gatunki ryb. Autoreferat. Załącznik Nr 2a. Olsztyn, 2016.
http://wnos.uwm.edu.pl/sites/default/files/u19/zalacznik_nr_2a_p_gomulka_autoreferat_wersja_polska.pdf
- Huttenhuis H. B. T., Grou C. P. O., Taverne-Thiele A. J., Taverne N., Rombout H. W. M.** (2006) Carp (*Cyprinus carpio* L.) innate immune factors are present before hatching. *Fish and Shellfish Immunology*. Volume 20, Issue 4, Pages 586-596
- Jurecka P., Wiegertjes G.F., Rakus K.L., Pilarczyk A., Irnazarow I.** (2009) Genetic resistance of carp (*Cyprinus carpio* L.) to *Trypanoplasma borreli*: Influence of transferrin polymorphisms. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 127, 19 – 2
- Kortet R., Vainikka A., Rantala M.J., Taskinen J.** (2004) "Sperm quality, secondary sexual characters and parasitism in roach (*Rutilus rutilus* L.)," *Biological Journal of the Linnean Society*, vol. 81, no. 1, pp. 111–117.
- Liljedal S., Folstad I., Skarstein F.** (2013) Secondary sex traits, parasites, immunity and ejaculate quality in the arctic charr. *Proc. R. Soc. Lond. B* (1999) 266, 1893-1898.
- Losdat S., Richner H., Blount J.D., Halfenstien F.** (2011) Immune activation reduces sperm quality in the great tit. *PLOS ONE* 6(7): e22221. Doi:10.1371/journal.pone.0022221.
- Rohlenova K., Morand S., Hyršl P., Tolarova S., Flajshans M., Simkova A.** (2011) Are fish immune systems really affected by parasites? an immunoecological study of common carp (*Cyprinus carpio*). *Parasites & Vectors* 2011;4:120 DOI: 10.1186/1756-3305-4-120.
- Saha N.R., Usami T., Suzuki Y.** (2002) Seasonal changes in the immune activities of common carp (*cyprinus carpio*). *Fish Physiology and Biochemistry* 26: 379-387.

8. Projekt jest objęty oceną retrospektywną²

² Wypełnia właściwa lokalna komisja etyczna ds. doświadczeń na zwierzętach. Należy zaznaczyć właściwe pole.

- ☐ TAK - na podstawie art. 53 ust. 1 ustawy
- ☐ TAK - na podstawie art. 53 ust. 3 ustawy
- ☐ NIE