

## Ειδικές Δράσεις «ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ»

ΜΑΓΙΑΤΙΚΟ Τ6ΥΒΠ-0068



### Παραδοτέο

<b>Αριθμός Παραδοτέου:</b>	Π1.5.1	<b>Μήνας Παράδοσης ΤΠΕ:</b>	17
<b>Τίτλος Παραδοτέου</b>	Επίδραση διαφορετικών αναπαραγωγικών ορμονών στην ποιότητα σπέρματος και συσχετισμός με τις αναπαραγωγικές ορμόνες στο αίμα		
<b>Ενότητα Εργασίας (ΕΕ):</b>	1	<b>Συντονιστής ΕΕ:</b>	ΙΘΑΒΒΥΚ
<b>Τίτλος ΕΕ:</b>	Διαχείριση γεννητόρων και αναπαραγωγή		
<b>Αριθμός Εργασίας:</b>	1.5	<b>Υπεύθυνος Παραδοτέου:</b>	ΙΘΑΒΒΥΚ
<b>Τίτλος εργασίας:</b>	Βελτίωση σπερμίας αρσενικών για την βελτίωση του ποσοστού γονιμοποίησης των παραγομένων αυγών		
<b>Εταίροι:</b>	ΙΘΑΒΒΥΚ	ΑΡΓΟ	
<b>Κατάσταση:</b>	Ολοκληρωμένο	<b>Μήνας παράδοσης:</b>	17
.....			

**Υπεύθυνοι ερευνητές για το παραδοτέο:** Φακριάδης, Ι. (ΙΘΑΒΒΥΚ), Μυλωνάς, Κ. (ΙΘΑΒΒΥΚ)

**Συνεργαζόμενοι ερευνητές:** Παπαδάκη, Μ. (ΙΘΑΒΒΥΚ), Ραφτόπουλος, Τ. (ΑΡΓΟ)

#### Σύντομη περιγραφή (ΤΠΕ):

Η έκθεση θα περιλαμβάνει την εκτίμηση των επιπέδων στεροειδών ορμονών στο αίμα και της ποιότητας σπέρματος αρσενικών γεννητόρων μαγιάτικου κατά τις ημέρες δειγματοληψίας 0, 3, 7, 14 μετά την ορμονική διαχείριση των ψαριών.





## Εισαγωγή

Οι γοναδοτροπίνες ωοθυλακιοτρόπος (follicle stimulating hormone - FSH) και ωχρινοποιητική (luteinizing hormone - LH) ορμόνη ρυθμίζουν την λειτουργία του όρχι μέσω της δράσης τους στην παραγωγή των στεροειδών (Schulz et al., 2010). Η σύνθεση και απελευθέρωση των γοναδοτροπινών ελέγχεται κυρίως από τη γοναδοεκλυτίνη (gonadotropin releasing hormone - GnRH). Στη συνέχεια, οι δύο γοναδοτροπίνες ρυθμίζουν την παραγωγή των οιστρογόνων, ανδρογόνων και προγεστερονών (Miura & Miura, 2001; Schulz, et al., 2010). Τα επίπεδα τεστοστερόνης (testosterone - T) και 11-κετοτεστοστερόνης (11-ketotestosterone - 11-KT) αυξάνονται βαθμιαία κατά τη σπερματογένεση, φθάνοντας τις υψηλότερες τιμές κατά τη σπερμιόγνεση ή ακριβώς πριν από την αρχή της σπερμιάσης (Vizziano et al., 2008). Στη συνέχεια, τα ανώριμα σπερματοζώαρια ωριμάζουν υπό την επίδραση της 17α,20β-διυδροξυ-4-πρεγνεν-3-όνη (17α,20β-dihydroxy-4-pregnen-3-one - 17,20β-P) (Miura & Miura, 2003; Schulz, et al., 2010).

Το ερευνητικό ενδιαφέρον των τελευταίων χρόνων έχει επικεντρωθεί στα θηλυκά μαγιάτικα, όπως συμβαίνει και με την αναπαραγωγή άλλων ειδών σε συνθήκες εκτροφής, λόγω της αποτυχίας των θηλυκών να ολοκληρώσουν την ωρίμανση των ωοκυττάρων τους, την ωορρηξία και ωοτοκία (Fakriadis et al., 2020c). Οι τελευταίες μελέτες έχουν επικεντρωθεί κυρίως στην επίλυση των αναπαραγωγικών δυσλειτουργιών των θηλυκών (Fakriadis et al., 2019; Fakriadis et al., 2020a; Fakriadis, et al., 2020c; Jerez et al., 2018; Sarih et al., 2018; Sarih et al., 2019; Sarih et al., 2020), αν και έχουν επισημανθεί δυσλειτουργίες και στα αρσενικά (Fakriadis & Mylonas, 2021; Zupa et al., 2017b), και σε αντίθεση με τα θηλυκά, η ποιότητα και ποσότητα σπέρματος που παρήγαγαν γεννήτορες που διατηρούνταν σε ιχθυοκλωβούς σε σχέση με χειρσαίες εγκαταστάσεις, δεν ήταν καλύτερες (Fakriadis, et al., 2020c). Επίσης, έχει παρατηρηθεί μειωμένη κινητικότητα σπερματοζωαρίων, διάρκεια κινητικότητας, ταχύτητας και περιεκτικότητας σε ATP σε δείγματα σπέρματος γεννητόρων που διατηρούνται σε εγκαταστάσεις εκτροφής σε σχέση με αλιευμένα ψάρια (Zupa et al., 2017a). Ενδεχομένως, τα παραπάνω να συντελούν και στα μειωμένα ποσοστά γονιμοποίησης που παρατηρούνται σε ωοτοκίες εκτρεφόμενων μαγιάτικων (Fakriadis, et al., 2019; Fakriadis, et al., 2020a; Fakriadis, et al., 2020c; Jerez, et al., 2018) και θα έπρεπε να ξεπεραστούν, ώστε να παράγονται αυγά καλής ποιότητας.

Ένας τρόπος για να ξεπεραστούν τέτοιου είδους δυσλειτουργίες είναι η χορήγηση εξωγενών ορμονών, όπως παρασκευάσματα γοναδοτροπινών (π.χ. LH, ανθρώπινη χοριονική γοναδοτροπίνη (human chorionic gonadotropin - hCG), εκχύλισμα υπόφυσης κυπρίνου (carp pituitary extract - CPE)), τα οποία επιδρούν στο επίπεδο της γονάδας, ή συνθετικά ανάλογα γοναδοεκλυτίνης (gonadotropin releasing hormone agonist - GnRHa) τα οποία επιδρούν στο επίπεδο της υπόφυσης (Mylonas et al., 2017). Από τις παραπάνω ομάδες ορμονών, η GnRHa εμφανίζει πλεονεκτήματα σε σχέση με τα παρασκευάσματα γοναδοτροπινών, εν μέρει λόγω χρήσης της GnRHa με εμφυτεύματα ελεγχόμενης έκλυσης, τα οποία καταλήγουν σε υψηλότερη απόδοση (Mylonas & Zohar, 2001; Mylonas et al., 2010). Έχει αναφερθεί σε πολλά είδη ψαριών ότι η GnRHa αυξάνει την παραγωγή σπέρματος (Clearwater & Crim, 1998; Mylonas et al., 1997a; Mylonas et al., 1997b; Sorbera et al., 1996; Vermeirssen et al., 2000), ακόμη και σε είδη όπως ο κυανόπτερος τόνος *Thunnus thynnus* (Corriero et al., 2009), ο οποίος εμφανίζει παρόμοιου τύπου αναπαραγωγικές δυσλειτουργίες σε αιχμαλωσία. Τα εμφυτεύματα GnRHa έχει αποδειχθεί ότι αυξάνουν και την σπερματογένεση σε είδη που χρησιμοποιούνται στην ιχθυοκαλλιέργεια, όπως το λαβράκι *Dicentrarchus labrax* (Rainis et al., 2003) και ο κρυνός *Argyrosomus regius* (Fakriadis et al., 2020b), αν και η επίδραση των παραπάνω θεραπειών στην ποιότητα του σπέρματος ποικίλει (Mylonas, et al., 2017). Από την άλλη, η χορήγηση hCG έχει δείχθει να αυξάνει τον όρο του σπέρματος σε άλλα ψάρια (Zadmajid, 2016), επομένως η χορήγησή της στο μαγιάτικο θα μπορούσε να αυξήσει την παραγωγή σπέρματος μέσω της αυξημένης ενυδάτωσής.

Ο στόχος της παρούσας μελέτης ήταν να ελεγχθεί: α) η αποτελεσματικότητα των εμφυτευμάτων GnRHa σε σχέση με ενέσεις hCG στην αύξηση της παραγωγής σπέρματος στο μαγιάτικο, όσον αφορά την ποσότητα και ποιότητα σπέρματος με τη χρήση αυτοματοποιημένης ανάλυσης σπέρματος (Computer Assisted Sperm Analysis - CASA) και β) η επίδραση των παραπάνω θεραπειών στα επίπεδα των στεροειδών ορμονών.



## Υλικά και Μέθοδοι

### Διαχείριση γεννητόρων και θεραπείες

Οι γεννήτορες διατηρούνταν σε ιχθυοκλωβό στις εγκαταστάσεις της εταιρείας Ιχθυοκαλλιέργειες Αργοσαρωνικού Α.Ε. και μεταφέρθηκαν στις εγκαταστάσεις των Aqualabs του Ινστιτούτου Θαλάσσιας Βιολογίας, Βιοτεχνολογίας και Υδατοκαλλιέργειών (ΙΘΑΒΒΥΚ) (Εικόνα 1). Εγκαταστάθηκαν σε μία δεξαμενή και τρέφονταν με ξηρή τροφή (Vitalis CAL, 22 mm, Skretting, Norway)(Πίνακας 1).

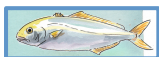


Εικόνα 1: Αναισθητοποίηση των ψαριών (αριστερά) για τη μεταφορά τους στο ΙΘΑΒΒΥΚ (δεξιά).

Πίνακας 1: Περιγραφή των διαφορετικών ομάδων γεννητόρων που διατηρούνταν σε δεξαμενές στα Aqualabs.

Γεννήτορες	Μέθοδος εκτροφής	Όγκος (m <sup>3</sup> )	Αριθμός ατόμων (Αρσ./Θηλ.)	Βάρος (kg)	Τροφή
S3	δεξαμενές	40	7/8	11,1-20,5	ξηρή τροφή

Οι γεννήτορες διατηρούνταν σε τεχνητά προσομοιωμένη φυσική φωτοπερίοδο και θερμοπερίοδο και το νερό που τους παρέχεται ήταν θαλασσινό νερό από γεώτρηση. Οι διαχειρίσεις των γεννητόρων έγιναν μετά από χρήση αναισθησίας. Πιο συγκεκριμένα, μετά από νηστεία δύο ημερών έγινε χρήση χαμηλής συγκέντρωσης αναισθησίας (γαρυφαλέλαιο 0.01ml l<sup>-1</sup>) στη δεξαμενή που βρίσκονταν οι γεννήτορες (Mylonas et al., 2005). Στη συνέχεια, τα ψάρια μεταφέρονταν χωριστά σε δεξαμενή 1 m<sup>3</sup> που περιείχε υψηλότερη συγκέντρωση αναισθητικού (γαρυφαλέλαιο 0.03ml l<sup>-1</sup>) με σκοπό την πλήρη αναισθητοποίησή τους, και έγινε λήψη βιοψίας ωοθηκών από τα θηλυκά και δείγματος σπέρματος από τα αρσενικά, με τη χρήση πλαστικού καθετήρα (Pipelle de Cornier, Laboratoire CCD, Γαλλία). Ένα τμήμα των βιοψιών των ωοθηκών παρατηρήθηκε αμέσως σε οπτικό μικροσκόπιο (40 and 100×) για την αξιολόγηση του σταδίου της ωογένεσης και τη μέτρηση της μέσης διαμέτρου των μεγαλύτερων ωοκυττάρων, με παράλληλη λήψη φωτογραφιών. Ένα άλλο τμήμα της βιοψίας μεταφέρθηκε σε φιαλίδιο που περιείχε συντηρητικό διάλυμα φορμόλης-γλουταραλδεύδης για περαιτέρω ιστολογική επεξεργασία. Η κατάσταση σπερμίας των αρσενικών αξιολογήθηκε σύμφωνα με την κλίμακα όπου S0: όταν τα ψάρια δεν απελευθερώνουν σπέρμα



μετά από ελαφρά κοιλιακή πίεση, S1: όταν τα ψάρια απελευθερώνουν λίγες σταγόνες σπέρματος μετά από επαναλαμβανόμενες προσπάθειες, S2: όταν τα ψάρια απελευθερώνουν κάποια ποσότητα σπέρματος μετά από την πρώτη εφαρμογή κοιλιακής πίεσης και S3: όταν τα ψάρια απελευθερώνουν σχεδόν χωρίς πίεση σπέρμα (Fakriadis, et al., 2020b). Τα δείγματα σπέρματος λήφθηκαν μετά από καθαρισμό και στέγνωμα του γεννητικού πόρου, για την αποφυγή επιμόλυνσης. Τα δείγματα διατηρήθηκαν σε πάγο μέχρι τη μεταφορά τους σε ψυγείο στους 4°C και αξιολογήθηκαν 2-3 ώρες μετά από την συλλογή. Οι γεννήτορες, μετά τη διαχείρισή τους μεταφέρονταν σε δεξαμενή με καθαρό θαλασσινό νερό.

### **Αξιολόγηση αναπαραγωγικής κατάστασης και θεραπείες**

Οι γεννήτορες της δεξαμενής S3 (**Πίνακας 1**), κατά την εκτιμώμενη αναπαραγωγική περίοδο αξιολογήθηκαν αναπαραγωγικά (ημέρα 0). Στα αρσενικά άτομα, μετά τη λήψη δείγματος σπέρματος και αίματος έγινε χορήγηση είτε εμφυτευμάτων ελεγχόμενης έκλυσης GnRH<sub>a</sub> (n=3) σε δόση 59±2 μg kg<sup>-1</sup> GnRH<sub>a</sub> ή hCG (n=4) σε δόση 617±46 IU kg<sup>-1</sup>. Από τα θηλυκά, μόνο ένα βρέθηκε σε κατάλληλη αναπαραγωγική κατάσταση (Fakriadis, et al., 2019) και του χορηγήθηκε εμφύτευμα GnRH<sub>a</sub> δόσης 97 μg kg<sup>-1</sup> GnRH<sub>a</sub>. Τα αρσενικά ψάρια ελέγχθηκαν ξανά στις ημέρες 3, 7 και 14 μετά τη θεραπεία και δείγματα σπέρματος και αίματος λαμβάνονταν σε κάθε ημέρα δειγματοληψίας, ενώ για τις ίδιες ημέρες δειγματοληψίας βιοψίες ωοθηκών λαμβάνονταν από τα θηλυκά ψάρια.

### **Αξιολόγηση της ποιότητας σπέρματος**

Τα δείγματα σπέρματος λήφθηκαν μετά από καθαρισμό και στέγνωμα του γεννητικού πόρου, για την αποφυγή επιμόλυνσης. Το κάθε δείγμα σπέρματος αποθηκεύτηκε σε φιαλίδια 1.5 ml και διατηρήθηκαν σε πάγο μέχρι τη μεταφορά τους σε ψυγείο στους 4°C, και αξιολογήθηκαν 2-3 ώρες μετά από την συλλογή. Οι παράμετροι που εκτιμήθηκαν ήταν: α) το ποσοστό κινούμενων σπερματοζωαρίων (%) με τη χρήση αυτοματοποιημένης ανάλυσης σπέρματος (computer assisted sperm analysis – CASA), β) η διάρκεια κίνησης μέχρι ποσοστού 5% των σπερματοζωαρίων (λεπτά), γ) πυκνότητα σπέρματος (σπερματοζωάρια ml<sup>-1</sup>) και δ) επιβίωση σπέρματος σε συντήρηση στους 4°C. Τα δείγματα ενεργοποιήθηκαν με χρήση θαλασσινού νερού το οποίο περιείχε BSA 2%, με στόχο αριθμό 200-300 κυττάρων στην οθόνη. Η κίνηση των σπερματοζωαρίων καταγράφηκε σε ειδικές αντικειμενοφόρους πλάκες βάθους 10 μm (Leja, IMV technologies) σε οπτικό μικροσκόπιο.

### **Εκτίμηση επιπέδων στεροειδών**

Ο ορός του αίματος διαχωρίστηκε με φυγοκέντριση και διατηρήθηκε στους -80°C μέχρι την ανάλυση. Για τον προσδιορισμό των στεροειδών (T, 11-KT, 17,20β-P και E<sub>2</sub>) χρησιμοποιήθηκαν ELISA kits (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI). Για τον προσδιορισμό των στεροειδών έγινε εξαγωγή δύο φορές 200 μl ορού αίματος με 2 ml διαιθυλεθέρα. Η εξαγωγή έγινε με έντονη περιδίνηση των δειγμάτων για 3 λεπτά (Vibramax 110; Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach, Germany). Στη συνέχεια, τα δείγματα καταψύχθηκαν για 10 λεπτά στους -80°C και η υπερκείμενη οργανική φάση μεταφέρθηκε σε νέα φιαλίδια και εξατμίστηκε υπό άζωτο (Pierce Reacti-Vap III, Thermo Scientific, Rockford, ΗΠΑ). Τα δείγματα ανασυστάθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα για την ανάλυσή τους με τη χρήση ELISA.

### **Ιστολογική επεξεργασία**

Οι βιοψίες των ωοθηκών αφυδατώθηκαν σε διαλύματα αυξανόμενης συγκέντρωσης αιθανόλης (70-96%) και στη συνέχεια εγκιβωτίστηκαν σε ρητίνη (Technovit 7100<sup>®</sup>, Heraeus Kulzer, Γερμανία). Ελήφθησαν τομές πάχους 3 μm με μικροτόμο (Leica RM 2245, Γερμανία). Έγινε χρώση των τομών με Methylene Blue (Sigma, Γερμανία)/Azure II (Sigma, Γερμανία)/Basic Fuchsin (Polysciences, ΗΠΑ) σύμφωνα με τους Bennett et al. (Bennett et al., 1976). Οι τομές ελέγχθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο (Nikon, Eclipse 50i) και φωτογραφήθηκαν με ψηφιακή κάμερα (Jenoptik progress C12 plus).



### Στατιστική ανάλυση

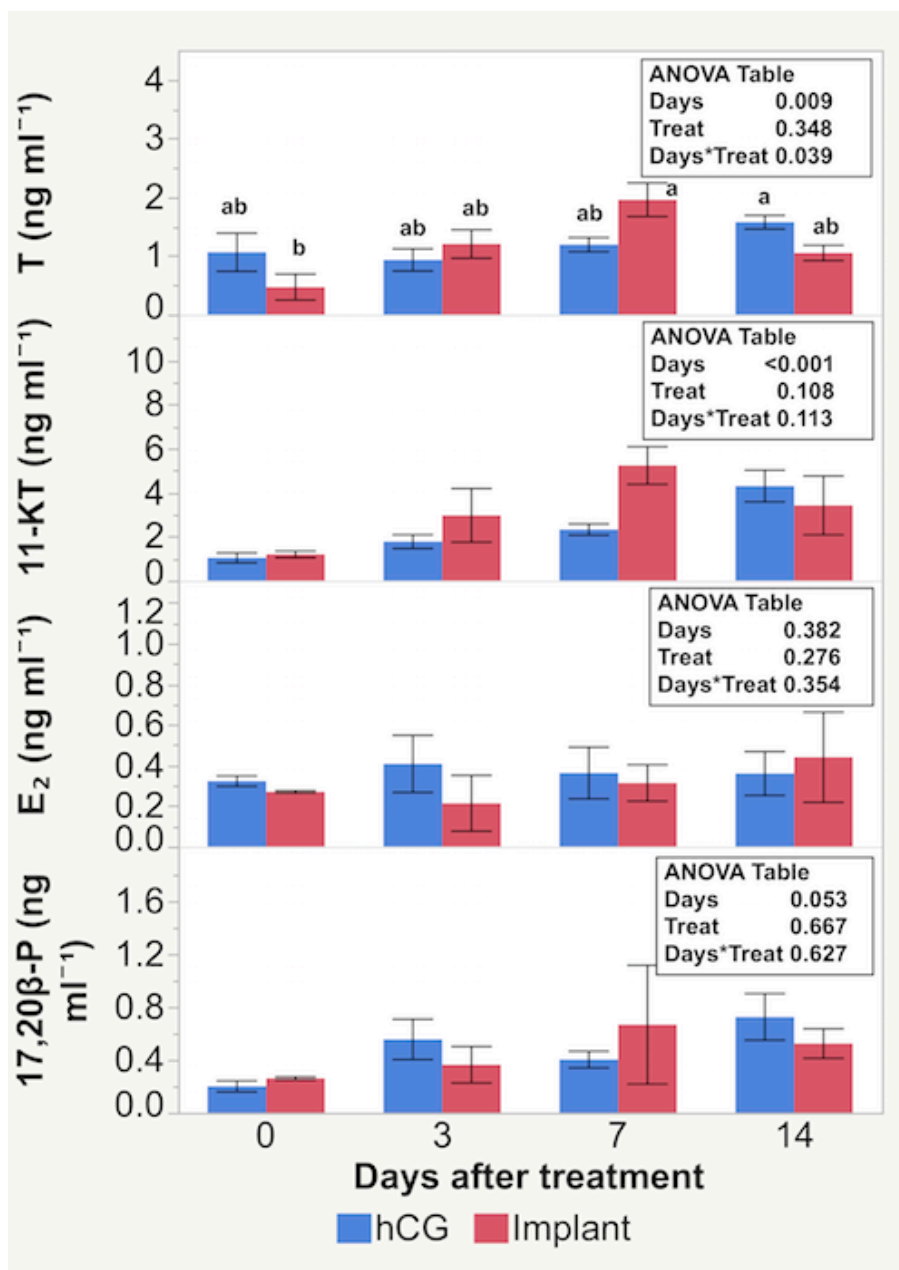
Τα στεροειδή και οι παράμετροι ποιότητας σπέρματος αναλύθηκαν με τη χρήση 2 way ANOVA, χρησιμοποιώντας ως ανεξάρτητες μεταβλητές τις «ημέρες μετά τη θεραπεία» (0, 3, 7, 14) και τη «θεραπεία» (hCG και GnRHα implants). Τα δεδομένα μετασχηματίστηκαν όταν δεν ακολουθούσαν κανονική κατανομή. Το επίπεδο σημαντικότητας της στατιστικής ανάλυσης ορίστηκε σε  $P < 0.05$ . Όταν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές τα δεδομένα υποβλήθηκαν σε Tukey HSD test.

### Αποτελέσματα

Τα αρσενικά δεν απελευθέρωναν σπέρμα μετά από κοιλιακή πίεση την ημέρα 0. Τα μισά ψάρια ( $n=2$ ) μετά τη θεραπεία με hCG ήταν σε κατάσταση σπερμίας S2 την ημέρα 3 και S3 την ημέρα 14 μετά από τη θεραπεία, ενώ ένα ψάρι βρέθηκε σε κατάσταση σπερμίας S2 3 ημέρες μετά τη θεραπεία με εμφυτεύματα GnRHα. Τα υπόλοιπα ψάρια δεν παρήγαγαν σπέρμα μετά από κοιλιακή πίεση.

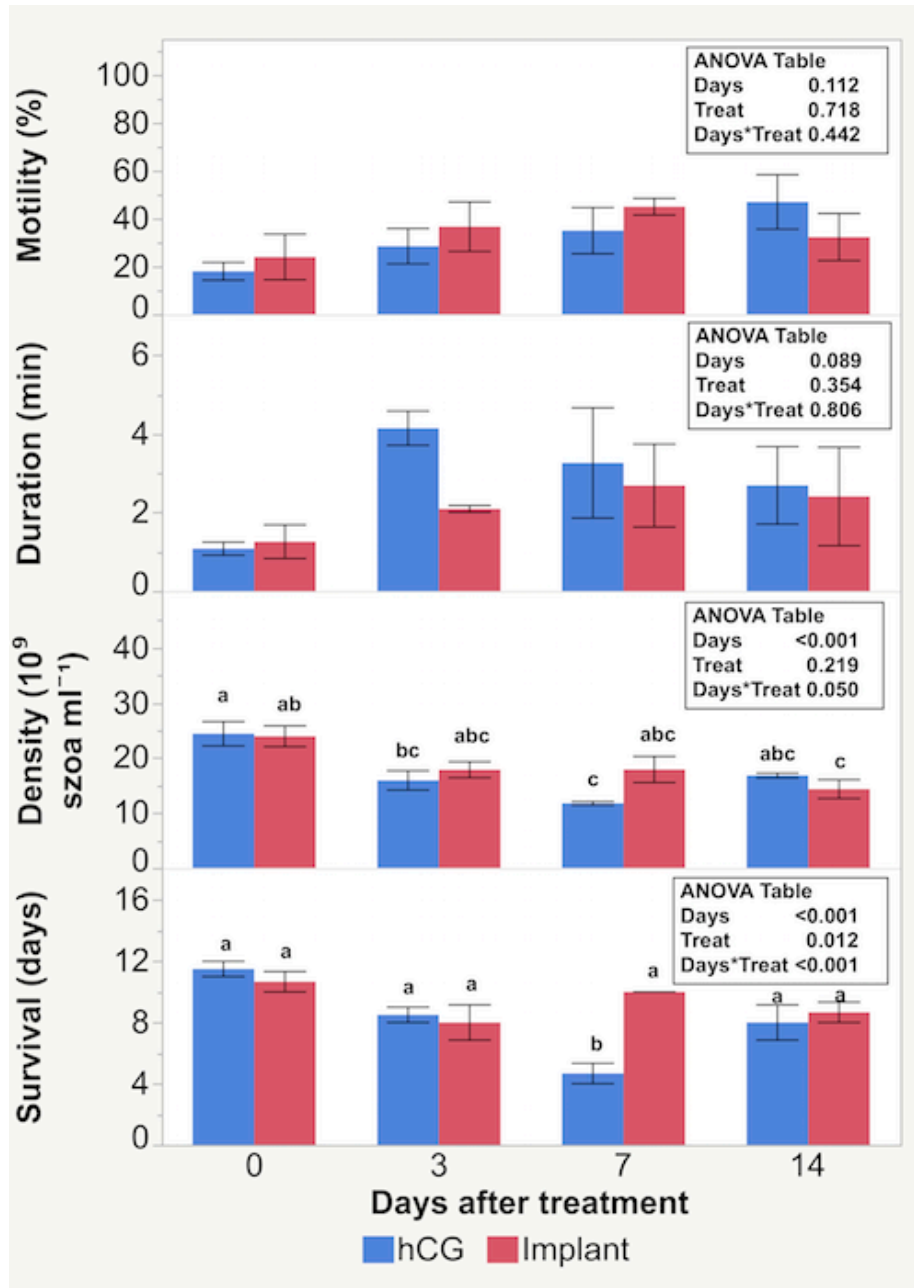
Η συγκέντρωση της T στον ορό του αίματος αυξήθηκε σημαντικά 7 ημέρες μετά τη θεραπεία με εμφυτεύματα GnRHα ενώ δεν διαφοροποιήθηκε σημαντικά μετά από τη θεραπεία με hCG (**Εικόνα 2**). Σημαντικά αυξήθηκε και η 11-KT, χωρίς ωστόσο να υπάρχει διαφοροποίηση μεταξύ των διαφορετικών θεραπειών. Τόσο η  $E_2$ , όσο και η  $17,20\beta$ -P δεν διαφοροποιήθηκαν στατιστικά σημαντικά μετά από τις θεραπείες.





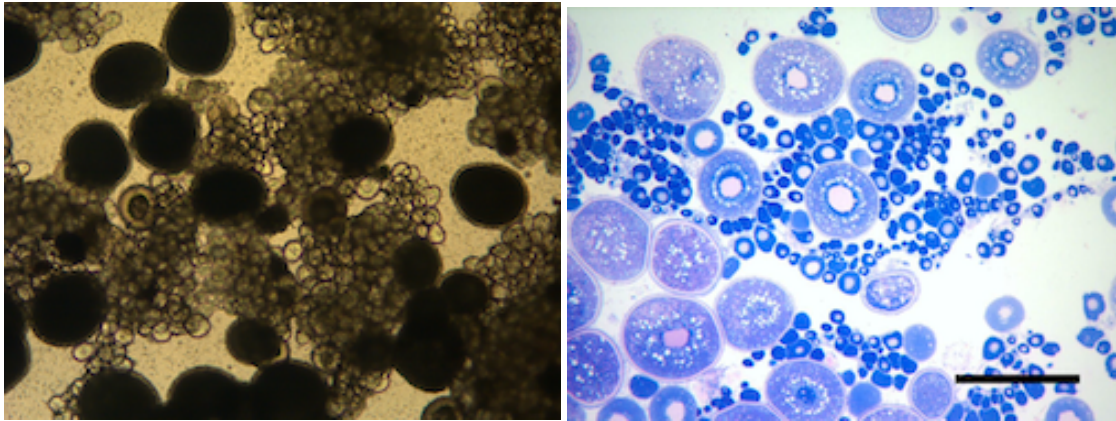
**Εικόνα 2:** Μέση τιμή ( $\pm$  τυπικό σφάλμα) τεστοστερόνης (T), 11-κετοτεστοστερόνης (11-KT), 17 $\beta$  – οιστραδιόλης (E<sub>2</sub>) και 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -διυδροξυ-4-πρεγνεν-3-όνης (17,20 $\beta$ -P) στον ορό αίματος αρσενικών γεννητόρων μαγιάτικου μετά από θεραπεία με hCG (n=4) ή GnRH $\alpha$  εμφυτεύματα (n=3). Η θεραπεία έγινε στην ημέρα 0. Τα δεδομένα υποβλήθηκαν σε στατιστική ανάλυση 2 way ANOVA, P<0.05.

Οι ορμονικές θεραπείες δεν επηρέασαν στατιστικά σημαντικά το ποσοστό κινητικότητας και τη διάρκεια κινητικότητας του σπέρματος, αν και παρατηρήθηκε τάση αύξησης της τελευταίας παραμέτρου μετά τις θεραπείες (Εικόνα 3). Η πυκνότητα του σπέρματος μειώθηκε σημαντικά 3 ημέρες μετά τη θεραπεία με hCG, και παρέμεινε μειωμένη και στις 7 ημέρες, αλλά ανέκαμψε στις αρχικές τιμές 14 ημέρες μετά. Η θεραπεία με εμφυτεύματα GnRH $\alpha$  προκάλεσε σημαντική μείωση της πυκνότητας του σπέρματος 14 ημέρες μετά τη θεραπεία. Όσον αφορά την επιβίωση του σπέρματος υπό ψύξη, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση 7 ημέρες μετά τη θεραπεία με hCG. Αντίθετα, η θεραπεία με εμφυτεύματα GnRH $\alpha$  δεν επέφερε σημαντικές αλλαγές στην ίδια παράμετρο.



**Εικόνα 3:** Μέση τιμή ( $\pm$  τυπικό σφάλμα) κινητικότητας (motility), διάρκειας κινητικότητας (duration), πυκνότητας (density) και επιβίωσης υπό ψύξη (survival) σπέρματος γεννητόρων μαγιάτικου μετά από θεραπεία με hCG (n=4) ή GnRHα εμφυτεύματα (n=3). Η θεραπεία έγινε στην ημέρα 0. Τα δεδομένα υποβλήθηκαν σε στατιστική ανάλυση 2 way ANOVA,  $P < 0.05$ .

Όσον αφορά τα θηλυκά, παρατηρήθηκε μόνο ένα άτομο να φέρει λεκιθογενή ωοκύτταρα σε προχωρημένη φάση (**Εικόνα 4**) παράλληλα με αρκετά πρωτογενή ωοκύτταρα, ενώ τα υπόλοιπα είχαν είτε πρωτογενή ωοκύτταρα είτε ωοκύτταρα σε αρχικά στάδια λεκιθογένεσης.



**Εικόνα 4:** Αποψη βιοψίας ωοθηκών θηλυκών γεννητόρων μαγιάτικου την ημέρα 0 του πειράματος, αμέσως μετά τη συλλογή τους (Αριστερά), και μετά από ιστολογική επεξεργασία. (Δεξιά). Μήκος μπάρας = 500  $\mu\text{m}$ .

### Συζήτηση

Στην παρούσα μελέτη επιβεβαιώθηκε ότι τα θηλυκά ψάρια που διατηρούνται σε χερσαίες δεξαμενές που τροφοδοτούνται με νερό γεώτρησης δεν καταφέρνουν να ολοκληρώσουν τη λεκιθογένεση στη συντριπτική τους πλειοψηφία, όπως έχει παρατηρηθεί και σε άλλες μελέτες με το ίδιο είδος (Fakriadis, et al., 2020c). Τα αρσενικά, αν και βρίσκονται σε κατάσταση σπερμίας, δεν παράγουν ικανή ποσότητα που θα μπορούσε να απελευθερωθεί με κοιλιακή πίεση, ενδεχομένως λόγω των ισχυρών μυικών στρωμάτων της κοιλιακής χώρας ή και της περιορισμένης παραγόμενης ποσότητας (Fakriadis & Mylonas, 2021). Οι ορμονικές θεραπείες, τόσο με hCG όσο και με εμφυτεύματα GnRHα προκάλεσαν την έκλυση ποσότητας σπέρματος την ημέρα 3 μετά από κοιλιακή πίεση σε κάποια από τα ψάρια. Το μαγιάτικο κατατάσσεται στην κατηγορία των ψαριών με μικρή παραγωγή σπέρματος σε συνθήκες εκτροφής, μια αναπαραγωγική δυσλειτουργία που έχει καταγραφεί για πολλά είδη ψαριών (Mylonas, et al., 2017).

Όσον αφορά τα στεροειδή, δεν παρατηρήθηκε έντονη διαφοροποίηση μετά την χορήγηση των θεραπειών, παρά μόνο η αύξηση της 11-KT, χωρίς ωστόσο η επίδραση να είναι διαφορετική μεταξύ των θεραπειών, και η σημαντική αύξηση της T κατά 4 φορές 7 ημέρες μετά τη θεραπεία με εμφυτεύματα GnRHα. Η αντίστοιχη αύξηση της T μετά από χορήγηση εμφυτευμάτων GnRHα στον κρανίο ήταν περίπου 10-12 φορές, και της 11-KT περίπου 3 φορές, 2 ημέρες μετά τη θεραπεία (Fakriadis, et al., 2020b). Στην ίδια μελέτη δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μετά τη θεραπεία στην 17,20 $\beta$ -P, όπως και στην παρούσα μελέτη. Ενδεχομένως, η δόση που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη να μην ήταν ικανή να προκαλέσει σημαντική αύξηση των στεροειδών και ενδέχεται να χρειάζεται περαιτέρω μελέτη για την εύρεση της βέλτιστης δόσης. Π.χ. η χρησιμοποιούμενη δόση hCG στα ψάρια σε πειράματα ενίσχυσης της σπερμίας έχει δειχθεί να είναι περίπου 2 φορές μεγαλύτερη από αυτή της παρούσας μελέτης (Mylonas, et al., 2017), ωστόσο σχετικές μελέτες στο μαγιάτικο δεν έχουν δημοσιευτεί. Η μοναδική μελέτη με χρήση hCG σε μαγιάτικο αναφέρει δόση 1000 IU  $\text{kg}^{-1}$ , με αναφορά μάλλον τόσο σε θηλυκά όσο και σε αρσενικά ψάρια, ωστόσο δεν έγιναν συγκριτικές μετρήσεις στεροειδών (Kozul et al., 2001). Στην ίδια μελέτη αναφέρεται ότι παρήχθησαν γονιμοποιημένα αυγά και τα αρσενικά έφεραν σπέρμα με ποσοστά κινητικότητας 50-90%, τιμές συγκριτικά υψηλότερες από την παρούσα μελέτη. Η χορήγηση εμφυτευμάτων GnRHα έγινε με την ίδια περίπου δόση που αναφέρεται σε σειρά πρόσφατων μελετών (Fakriadis & Mylonas, 2021; Fakriadis, et al., 2019; Fakriadis, et al., 2020a; Fakriadis, et al., 2020c; Jerez, et al., 2018), κατά τις οποίες έχουν συλλεχθεί κατά περίπτωση καλής ποιότητας γονιμοποιημένα αυγά, δηλαδή τα αρσενικά παρήγαγαν ικανές ποσότητες σπέρματος για την γονιμοποίηση των αυγών. Ωστόσο, παραμένει το ερώτημα αν καλύτερη παραγωγή σπέρματος από τα αρσενικά θα μπορούσε να βελτιώσει τα σχετικά χαμηλά ποσοστά γονιμοποίησης που παρατηρούνται στο μαγιάτικο, σε σχέση με άλλα είδη όπως ο κρανιός, η τσιπούρα και το λαβράκι (Karamanlidis, 2017; Mylonas et al., 2016; Superio et al., 2021).





Όσον αφορά τις παραμέτρους ποιότητας σπέρματος του μαγιατικού, δεν παρατηρήθηκαν ιδιαίτερες διαφοροποιήσεις τόσο σε σχέση με την ημέρα 0 του πειράματος όσο και μεταξύ των θεραπειών. Αυτό που αξίζει να σημειωθεί είναι η μείωση της πυκνότητας του σπέρματος μετά τη χορήγηση hCG που παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη, η οποία ενδέχεται να σχετίζεται με την αύξηση της ποσότητας του σπερματικού υγρού, χωρίς την απαραίτητη αύξηση των παραγόμενων σπερματοζωαρίων (Mylonas, et al., 2017). Αυτό είναι και ένα από τα πλεονεκτήματα της χορήγησης hCG, που το επίπεδο δράση της είναι στην γονάδα, άρα και πιο άμεσο σε σχέση με την GnRHα για παράδειγμα. Ταυτόχρονα, μπορεί να είναι και ένα από τα ελαττώματά της, αφού έχει περιορισμένο χρόνο διατήρησης στο αίμα, για αυτό και για πιο μακροπρόθεσμα αποτελέσματα χρειάζεται η επαναλαμβανόμενη χορήγησή της, κάτι που μπορεί να προκαλέσει την ανοσολογική απόκριση του οργανισμού στον οποίο χορηγείται. Αντίθετα, η GnRHα δεν μπορεί να προκαλέσει τέτοια προβλήματα, ενώ έχει δειχθεί να ενισχύει και την διαδικασία της σπερματογένεσης (Fakriadis, et al., 2020b; Mylonas, et al., 2016). Οι τιμές ποσοστού κινητικότητας που καταγράφηκαν στην παρούσα μελέτη ήταν χαμηλότερες από αυτές που έχουν καταγραφεί για το ίδιο είδος (Fakriadis & Mylonas, 2021), αλλά οι υπόλοιπες μετρούμενες παράμετροι ήταν στο εύρος διακύμανσης τιμών άλλων μελετών (Fakriadis & Mylonas, 2021; Fakriadis, et al., 2020c; Jerez, et al., 2018).

**Διαφοροποιήσεις από ΤΠΕ:** Καμία.

### **Βιβλιογραφία**

- Bennett, H.S., Wyrick, A.D., Lee, S.W., McNeil, J.H., 1976. Science and art in preparing tissues embedded in plastic for light microscopy, with special reference to glycol methacrylate, glass knives and simple stains. *Stain Technology*. 51, 71-97.
- Clearwater, S.J., Crim, L.W., 1998. Gonadotropin releasing hormone-analogue treatment increases sperm motility, seminal plasma pH and sperm production in yellowtail flounder *Pleuronectes ferrugineus*. *Fish Physiology and Biochemistry*. 19, 349-357.
- Corriero, A., Medina, A., Mylonas, C.C., Bridges, C.R., Santamaria, N., Deflorio, M., Losurdo, M., Zupa, R., Gordin, H., de la Gándara, F., Belmonte Ríos, A., Pousis, C., De Metrio, G., 2009. Proliferation and apoptosis of male germ cells in captive Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus L.*) treated with gonadotropin releasing hormone agonist (GnRHα). *Animal Reproduction Science*. 116, 346-357.
- Fakriadis, I., Mylonas, C.C., 2021. Sperm quality of greater amberjack *Seriola dumerili* throughout the reproductive season and in response to GnRHα treatment with controlled release implants. *Fish Physiology and Biochemistry*.
- Fakriadis, I., Lisi, F., Sigelaki, I., Papadaki, M., Mylonas, C.C., 2019. Spawning kinetics and egg/larval quality of greater amberjack (*Seriola dumerili*) in response to multiple GnRHα injections or implants. *General and Comparative Endocrinology*. 279, 78-87.
- Fakriadis, I., Miccoli, A., Karapanagiotis, S., Tsele, N., Mylonas, C.C., 2020a. Optimization of a GnRHα treatment for spawning commercially reared greater amberjack *Seriola dumerili*: Dose response and extent of the reproductive season. *Aquaculture*. 521, 735011.
- Fakriadis, I., Zanatta, E.M., Fleck, R., Sena Mateo, D.L., Papadaki, M., Mylonas, C.C., 2020b. Endocrine regulation of long-term enhancement of spermiation in meagre (*Argyrosomus regius*) with GnRHα controlled-delivery systems. *Gen Comp Endocrinol*. 297, 113549.
- Fakriadis, I., Sigelaki, I., Papadaki, M., Papandroulakis, N., Raftopoulos, A., Tsakoniti, K., Mylonas, C.C., 2020c. Control of reproduction of greater amberjack *Seriola dumerili* reared in aquaculture facilities. *Aquaculture*. 519, 734880.
- Jerez, S., Fakriadis, I., Papadaki, M., Martín, M., Cejas, J., Mylonas, C.C., 2018. Spawning induction of first-generation (F1) greater amberjack *Seriola dumerili* in the Canary Islands, Spain using GnRHα delivery systems. *Fishes*. 3, 1-22.
- Karamanlidis, D., 2017. Evolution of sex ratio and egg production in a population of gilthead seabream (*Sparus aurata*) over the course of five reproductive seasons, Biology Department. University of Crete, Crete, Greece, pp. 46.



- Kozul, V., Skaramuca, B., Glamuzina, B., Glavic, N., Tutman, P., 2001. Comparative gonadogenesis and hormonal induction of spawning of cultured and wild mediterranean amberjack (*Seriola dumerili*, Risso 1810). *Scientia Marina*. 65, 215-220.
- Miura, T., Miura, C., 2001. Japanese eel: a model for analysis of spermatogenesis. *Zoological Science*. 18, 1055-1063.
- Miura, T., Miura, C.I., 2003. Molecular control mechanisms of fish spermatogenesis. *Fish Physiology and Biochemistry*. 28, 181-186.
- Mylonas, C.C., Zohar, Y., 2001. Use of GnRHa-delivery systems for the control of reproduction in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 10, 463-491.
- Mylonas, C.C., Fostier, A., Zanuy, S., 2010. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *General and Comparative Endocrinology*. 165, 516-534.
- Mylonas, C.C., Duncan, N.J., Asturiano, J.F., 2017. Hormonal manipulations for the enhancement of sperm production in cultured fish and evaluation of sperm quality. *Aquaculture*. 472, 21-44.
- Mylonas, C.C., Gissis, A., Magnus, Y., Zohar, Y., 1997a. Hormonal changes in male white bass (*Morone chrysops*) and evaluation of milt quality after treatment with a sustained-release GnRHa delivery system. *Aquaculture*. 153, 301-313.
- Mylonas, C.C., Scott, A.P., Vermeirssen, E.L., Zohar, Y., 1997b. Changes in plasma gonadotropin II and sex steroid hormones, and sperm production of striped bass after treatment with controlled-release gonadotropin-releasing hormone agonist-delivery systems. *Biology of Reproduction*. 57, 669-675.
- Mylonas, C.C., Cardinaletti, G., Sigelaki, I., Polzonetti-Magni, A., 2005. Comparative efficacy of clove oil and 2-phenoxyethanol as anesthetics in the aquaculture of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) at different temperatures. *Aquaculture*. 246, 467-481.
- Mylonas, C.C., Salone, S., Biglino, T., de Mello, P.H., Fakriadis, I., Sigelaki, I., Duncan, N., 2016. Enhancement of oogenesis/spermatogenesis in meagre *Argyrosomus regius* using a combination of temperature control and GnRHa treatments. *Aquaculture*. 464, 323-330.
- Rainis, S., Mylonas, C.C., Kyriakou, Y., Divanach, P., 2003. Enhancement of spermiation in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) at the end of the reproductive season using GnRHa implants. *Aquaculture*. 219, 873-890.
- Sarih, S., Djellata, A., La Barbera, A., Fernández-Palacios Vallejo, H., Roo, J., Izquierdo, M., Fernández-Palacios, H., 2018. High-quality spontaneous spawning in greater amberjack (*Seriola dumerili*, Risso 1810) and its comparison with GnRHa implants or injections. *Aquaculture Research*. 49, 3442-3450.
- Sarih, S., Djellata, A., Roo, J., Hernández-Cruz, C.M., Fontanillas, R., Rosenlund, G., Izquierdo, M., Fernández-Palacios, H., 2019. Effects of increased protein, histidine and taurine dietary levels on egg quality of greater amberjack (*Seriola dumerili*, Risso, 1810). *Aquaculture*. 499, 72-79.
- Sarih, S., Djellata, A., Fernández-Palacios, H., Ginés, R., Fontanillas, R., Rosenlund, G., Izquierdo, M., Roo, J., 2020. Adequate n-3 LC-PUFA levels in broodstock diets optimize reproductive performance in GnRH injected greater amberjack (*Seriola dumerili*) equaling to spontaneously spawning broodstock. *Aquaculture*. 520, 735007.
- Schulz, R.W., de França, L.R., Lareyre, J.-J., LeGac, F., Chiarini-Garcia, H., Nobrega, R.H., Miura, T., 2010. Spermatogenesis in fish. *General and Comparative Endocrinology*. 165, 390-411.
- Sorbera, L.A., Mylonas, C.C., Zanuy, S., Carrillo, M., Zohar, Y., 1996. Sustained administration of GnRHa increases milt volume without altering sperm counts in the sea bass. *Journal of Experimental Zoology*. 276, 361-368.
- Superio, J., I., F., Tsigenopoulos, C.S., Lancerotto, S., Rodriguez, A.V., Vervelakis, E., Mylonas, C.C., 2021. Spawning kinetics and parentage contribution of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) broodstocks and influence of GnRHa-induced spawning. *Aquaculture Reports*, (under review).
- Vermeirssen, E.L.M., Shields, R.J., Mazorra de Quero, C., Scott, A.P., 2000. Gonadotrophin-releasing hormone agonist raises plasma concentrations of progestogens and enhances milt fluidity in male Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Fish Physiology and Biochemistry*. 22, 77-87.
- Vizziano, D., Fostier, A., Loir, M., Le Gac, F., 2008. Testis development, its hormonal regulation and spermiation induction in teleost fish, in: Alavi, S.M.H., Cosson, J., Coward, K., Rafiee, G. (Eds.), *Fish Spermatology*. Alpha Science Intl, Oxford (UK), pp. 103-139.



- Zadmajid, V., 2016. Comparative effects of human chorionic gonadotropin (hCG) and Ovaprim™ (sGnRHa+domperidone) on the reproductive characteristics of wild-caught male Longspine scraper, *Capoeta trutta* (Heckel, 1843). *Aquaculture*. 463, 7-15.
- Zupa, P., Fauvel, C., Mylonas, C.C., Pousis, C., Santamaria, C.A., Papadaki, M., Fakriadis, I., V., C., 2017a. Rearing in captivity affects spermatogenesis and sperm quality in greater amberjack, *Seriola dumerili* (Risso, 1810). *Journal of animal science*. 95, 4085-4100.
- Zupa, R., Rodríguez, C., Mylonas, C.C., Rosenfeld, H., Fakriadis, I., Papadaki, M., Pérez, J.A., Pousis, C., Basilone, G., Corriero, A., 2017b. Comparative study of reproductive development in wild and captive-reared greater amberjack *Seriola dumerili* (Risso, 1810). *PLoS One*. 12, e0169645.

