



Fakulta rybnářství
a ochrany vod
Faculty of Fisheries
and Protection
of Waters

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice



Fakulta rybnářství
a ochrany vod
Faculty of Fisheries
and Protection
of Waters

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Hormonální stimulace spermiace reofilních druhů jesetera malého a pamičky žraločů pomocí PLGA mikročasticových systémů s řízeným uvolňováním gonadoliberinu

P. Podhorec, J. Knowles, J. Vysloužil,
S. Boryshpolets, M. Rodina, B. Dzyuba



ISBN 978-80-7514-142-2





Fakulta rybnářství
a ochrany vod
Faculty of Fisheries
and Protection
of Waters

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Hormonální stimulace spermiace reofilních druhů jesetera malého a parmičky žraločí pomoci PLGA mikročasticových systémů s řízeným uvolňováním gonadoliberinu

P. Podhorec, J. Knowles, J. Vysloužil, S. Boryshpolets,
M. Rodina, B. Dzyuba

Vodňany, 2022



EVROPSKÁ UNIE
Evropský námořní a rybářský fond
Operační program Rybářství

**Vydání a tisk publikace byly uskutečněny v rámci Operačního programu
Rybářství 2014–2020:**

„Metodika X“ č. CZ.10.5.109/5.2/4.0/20_017/0001095

Obsahová část metodiky je výsledkem řešení výzkumných projektů:
NAZV projekt č. QK1920326 – Akvakultura reofilních druhů ryb (100%)



č. 194

ISBN 978-80-7514-142-2

OBSAH

1. CÍL METODIKY	7
2. VLASTNÍ POPIS METODIKY	7
2.1. Hormonálně stimulovaná reprodukce reofilních druhů ryb	7
2.2. PLGA mikročásticový systém s řízeným uvolňováním GnRHa	8
2.3. Modelové druhy reofilních ryb	10
2.4. Metodika přípravy PLGA mikročástic	10
2.5. Doporučené dávkování PLGA mikročásticových systémů s řízeným uvolňováním mGnRHa	13
2.6. Forma aplikace PLGA mikročásticových systémů s řízeným uvolňováním	13
2.7. Příprava reofilních druhů ryb před umělým výtěrem spermatu	14
2.8. Odběr spermatu	15
2.9. Hormonální odezva rybiho organizmu po ošetření PLGA mikročásticovým systémem s řízeným uvolňováním mGnRHa	16
2.10. Kvantitativní parametry odebraného spermatu po ošetření PLGA mikročásticovým systémem s řízeným uvolňováním mGnRHa	19
2.11. Kvalitativní parametry odebraného spermatu po ošetření PLGA mikročásticovým systémem s řízeným uvolňováním mGnRHa	22
2.12. Shrnutí	24
3. SROVNÁNÍ „NOVOSTI POSTUPŮ“	24
4. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY	25
5. EKONOMICKÉ ASPEKTY	25
6. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY	25
7. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE	26



HORMONÁLNÍ STIMULACE SPERMIACE REOFILNÍCH DRUHŮ JESETERA MALÉHO A PARMÍČKY ŽRALOČÍ POMOCÍ PLGA MIKROČÁSTICOVÝCH SYSTÉMŮ S ŘÍZENÝM UVOLŇOVÁNÍM GONADOLIBERINU

1. CÍL METODIKY

Optimalizace hormonální stimulace spermiace modelových druhů reofilních ryb – jesetera malého (*Acipenser ruthenus*) a parmičky žraločí (*Balantiocheilos melanopterus*) pomocí mikročasticových systémů na bázi kopolymeru kyseliny mléčné a glykolové (PLGA) s řízeným uvolňováním savčích analogů gonadoliberinu.

2. VLASTNÍ POPIS METODIKY

2.1. Hormonálně stimulovaná reprodukce reofilních druhů ryb

Vlivem nevhodného stavu vodních toků (špatný morfologicko-ekologický stav, snížená kvalita a kvantita vody, tlak predátorů) je vysazování akvakulturně vyprodukovaných násad reofilních druhů ryb jeden z nejvýznamnějších faktorů vedoucích k posílení jejich populací a druhové pestrosti. Produkce násady reofilních ryb, ať už do volných vod nebo do intenzivní akvakultury, je plně závislá na umělém nebo poloumělém výtěru. Optimalizace umělého výtěru reofilních ryb je tak klíčovým faktorem vedoucím k zajištění stabilní produkce kvalitního násadového materiálu.

Potřeba hormonálně vyvolané umělé reprodukce je založena na neschopnosti reofilních druhů ryb podstoupit finální zrání gamet v kontrolovaných podmínkách (Podhorec a Kouřil, 2009) nebo potřebě synchronizace zrání samčích a samičích gamet. Absencí finálního zrání gamet jsou v zajetí postiženy hlavně samice reofilních druhů (Mylonas a kol., 2010), zatímco u samců se primárně střetáváme se sníženou schopností produkovat kvalitní sperma. Příčinou výše popsané dysfunkce jsou odlišné podmínky prostředí v zajetí, které se výrazně liší od podmínek v přirozeném říčním prostředí (Zohar a Mylonas, 2001). Historicky nejstarším řešením této reprodukční dysfunkce bylo podávání preparátů založené na aplikaci exogenního luteinizačního hormonu (LH), např. ve formě kapří hypofýzy (Yaron a kol., 2009). Objev gonadoliberinu (GnRH), jakožto ústředního regulátora reprodukční kaskády a následná syntéza superaktivních GnRH analogů (GnRH_a), umožnily vzniknout účinné reprodukční terapii u ryb. Jednou z významných výhod neuropeptidu GnRH_a je možnost aplikace formou systémů s řízeným uvolňováním.

Vedle typu hormonálně účinné látky je zásadním faktorem ovlivňujícím účinnost přípravku forma jeho administrace. V případě „klasické“ aplikace v podobě rozpuštění účinné látky ve fyziologickém roztoku je výraznou překážkou rychle postupující enzymatická degradace aplikovaného peptidu

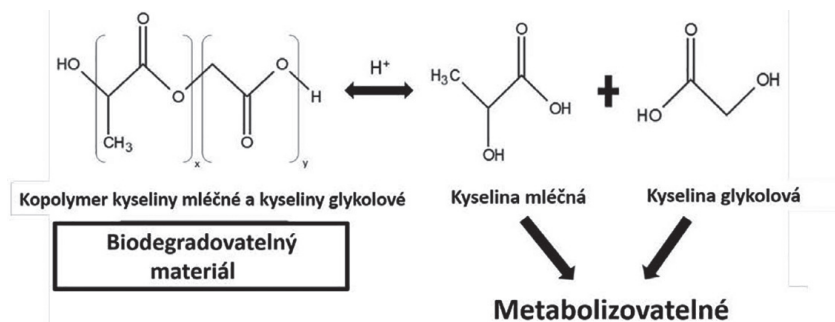
snižující jeho účinnost (Zohar a kol., 1989). Po podání dosáhne koncentrace peptidu v plazmě svého maxima a poté v průběhu desítek minut až několika hodin velmi rychle klesá (Mylonas a kol., 2017). K dlouhodobému udržení efektivní hladiny GnRHa je proto zapotřebí opakované podání, jinak klesá plazmatická koncentrace peptidu pod účinnou hladinu. Řešením jsou systémy s řízeným uvolňováním umožňující dlouhodobé a kontrolované uvolňování účinné látky (Mylonas a Zohar, 2001). Mezi nejčastěji využívané systémy s řízeným uvolňováním GnRHa v akvakultuře patří implantáty ethylen-vinyl-acetátu (EVAc), cholesterolové pelety nebo mikročástice na bázi kopolymeru kyseliny mléčné a glykolové (PLGA) (Mylonas a Zohar, 2001). S využitím systémů s řízeným uvolňováním GnRHa umožňujících dlouhodobou stimulaci sekrece LH se setkáváme téměř výhradně u mořských druhů ryb s asynchronním zráním oocytů a opakovaným třením v rozestupu několika dní až týdnů (Mylonas a kol., 1997). Aplikace systémů s řízeným uvolňováním vedla u těchto druhů ryb k úspěšné stimulaci spermatogeneze (Mylonas a Zohar, 2001; Rainis a kol., 2003). V případě sladkovodní akvakultury nevedly dosud publikované pokusy s řízeným uvolňováním GnRHa k významnému zlepšení spermiace u studovaných druhů (Linhart a kol., 1995; Alavi a kol., 2012). Námí předkládaná metodika popisuje pro akvakulturu reofilních druhů ryb inovativní postup stimulace spermiace formou PLGA mikročásticových systémů s řízeným uvolňováním mGnRHa. PLGA mikročásticový systém s řízeným uvolňováním mGnRHa je možné pořídit na Ústavu farmaceutické technologie v Brně, Farmaceutická fakulta, Masarykova univerzita, PharmDr. Jakub Vysloužil, Ph.D.

2.2. PLGA mikročásticový systém s řízeným uvolňováním GnRHa

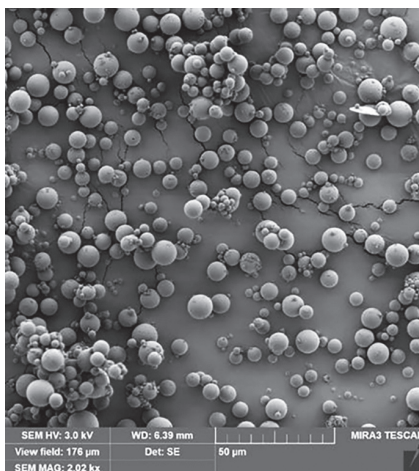
Předložená metodika představuje systém s řízeným uvolňováním mGnRHa na bázi PLGA ve tvaru pevných částic kulovitěho tvaru a velikosti 15–25 μm (Obr. 2 a Obr. 3). PLGA mikročástice se vyznačují vysokou úrovní biokompatibility a biodegradibility (Han a kol., 2016) a v organismu se rozkládají na organismu přirozenou kyselinu mléčnou a kyselinu glykolovou (Obr. 1). Mikročástice mají homogenní vnitřní strukturu bez obalu tvořenou polymerem s rovnoměrně rozprostřenou aktivní látkou s excipienty (Han a kol., 2016). Výhodou mikročástic je jejich vícedílný charakter, tzn., léčivá látka je distribuována v mnoha malých samostatných mikročásticích. Díky tomu je léčivá látka rovnoměrněji rozmístěna v místě aplikace a při případném selhání jedné jednotky nedochází k selhání celé dávky (Lengyel a kol., 2019). PLGA mikročástice s hydrofilním neuropeptidem mGnRHa jsou syntetizovány tzv. metodou odpaření rozpouštědla za využití dvojité emulze. Charakteristickým rysem využívaných PLGA mikročástic je kinetika uvolňování GnRHa,

HORMONÁLNÍ STIMULACE SPERMIAČE REOFILNÍCH DRUHŮ JESETERA MALÉHO A PARMÍČKY ŽRALOČÍ POMOCÍ PLGA MIKROČÁSTICOVÝCH SYSTÉMŮ S ŘÍZENÝM UVOLŇOVÁNÍM GONADOLIBERINU

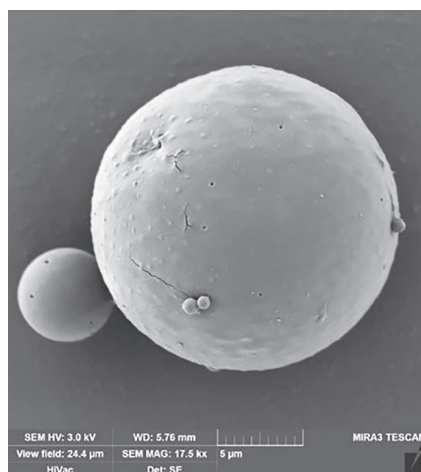
představovaná počátečním uvolněním signifikantního množství léčiva krátce po aplikaci s následným graduálním poklesem do vyčerpání zásoby léčiva (Obr. 5). PLGA mikročástice jsou aplikovány formou kapalně suspenze, což umožňuje přesné dávkování i menším druhům ryb, na bázi objem versus hmotnost ryby. Přesné dávkování PLGA mikročástic je velkou výhodou oproti jiným systémům s řízeným uvolňováním, kdy je velikost systému, resp. implantátu, pevně daná (Mylonas a Zohar, 2001).



Obr. 1. Degradace PLGA v rybím organismu.



Obr. 2. Snímek vzorku mikročástic ze skenovacího elektronového mikroskopu (Měřítka 50 µm) (Foto: J. Vysloužil).



Obr. 3. Snímek PLGA mikročástice ze skenovacího elektronového mikroskopu (Měřítka 5 μm) (Foto: J. Vysloužil).

2.3. Modelové druhy reofilních ryb

Za účelem ověření účinnosti PLGA mikročasticového systému s řízeným uvolňováním GnRHa stimulovat spermiaci byly vybrány dva druhy reofilních ryb. Jako modelový druh manifestující lehkou formu reprodukční dysfunkce v podobě zhoršené úrovně spermiace byl vybrán nepůvodní reofilní druh – parmička žraločí (*Balantiocheilos melanopterus*) a za účelem vyhodnocení dopadu experimentálního ošetření na indukci a synchronizaci spermiace byl vybrán původní reofilní druh trvale držený v kontrolovaných podmínkách – jeseter malý (*Acipenser ruthenus*). Při výběru modelových druhů reofilních ryb bylo přihlíženo rovněž k velikosti reofilních ryb, náročnosti na chov a možnosti celoroční práce s daným druhem.

2.4. Metodika přípravy PLGA mikročastic

Doporučenou metodou přípravy PLGA mikročastic je tzv. odpaření rozpouštědla z násobné emulze voda/olej/voda (Obr. 5). Princip metody spočívá v odpaření těkavého organického rozpouštědla, ve kterém se polymer rozpustí, a v tomto roztoku se dále disperguje léčivo ve formě roztoku, emulze či suspenze. Během odpařování organického rozpouštědla se z polymeru vytvoří pevná, vysoce sférická částice, která zachytí léčivo ve své struktuře. To je rozptýleno v celém objemu částice relativně rovnoměrně, takže léková forma

HORMONÁLNÍ STIMULACE SPERMIACE REOFILNÍCH DRUHŮ JESETERA MALÉHO A PARIČKY ŽRALOČÍ POMOCI PLGA MIKROČÁSTICOVÝCH SYSTÉMŮ S ŘÍZENÝM UVOLŇOVÁNÍM GONADOLIBERINU

má pak matricový charakter. Jako hormonálně účinné látky inkorporovatelné do PLGA kopolymeru se využívají analogy gonadoliberinu, v námi využitě metodice se konkrétně jedná o savčí analog GnRH s komerčním názvem Alarelin, APExBIO, USA. Stejně jako původní molekula GnRH je mGnRHa peptid s vysokou rozpustností ve vodě. Jako nosný materiál se použije kopolymer kyseliny mléčné a kyseliny glykolové, konkrétně Resomer® 753 (75% kyselina polymléčná, 25% kyselina polyglykolová).

Prvním krokem celé přípravy (Radinová, 2021) je přichystání jednotlivých fází. K přípravě olejové fáze se do zkumavky se širokým hrdlem naváží 800 mg PLGA příslušného Resomer® 753, Evonik, Německo a 5 g dichlormethanu. Obsah se uzavře a ponechá k samovolnému rozpuštění. Vnitřní vodná fáze se připraví rozpuštěním želatiny v čištěné vodě při 65 °C. Vnější vodná fáze sestává ze dvou různých roztoků, konkrétně z předem smíchaného 1% roztoku polyvinylalkoholu (PVA, Sigma Aldrich, USA) a hlavní kontinuální vodné fáze s koncentrací PVA 0,1%. PVA roztoky se připraví za zvýšené teploty (přibližně 90 °C) den předem, aby roztok mohl vychladnout, jinak by hrozilo vyvaření dichlormethanu při smíchání fází.

Následuje samotná příprava emulze z jednotlivých fází a její další úprava (Obr. 4). Do mikrocentrifugační zkumavky je naváženo 10 mg mGnRHa a pomocí stříkačky je přidáno 1,5 ml 10% roztoku želatiny. Obsah je za pomoci vortexu řádně promíchán, aby se léčivo rozpustilo. Výsledný roztok je poté nalit do širší skleněné zkumavky, ve které byla již předtím připravena olejová fáze rozpuštěním příslušného PLGA polymeru (800 mg/5 g). Směs je důkladně promíchána pomocí vortexu (30 s), aby byla zajištěna primární emulgace. Tím se vytvoří primární emulze voda/olej. Ta je následně promíchávána po dobu 1 minuty za použití homogenizátoru. Díky tomu vzniknou mnohem menší kapičky dispergované fáze, a vytvoří se tak velmi jemná emulze. Následně je do zkumavky přidáno 12 g 1% roztoku PVA (koncentrovaná vnější vodná fáze) pro předmíchání a promíchání za pomoci homogenizátoru (1 minuta) se vytvoří koncentrovaný emulzní systém voda/olej/voda. Ten je poté přidán do větší kádinky s 200 ml 0,1% roztoku PVA s 2% NaCl (hlavní část kontinuální vnější vodné fáze) pro doředění násobné emulze. Obsah kádinky je nepetržitě míchán po dobu dvou hodin za použití hřídelového míchadla nastaveného na 450 otáček za minutu (Obr. 5). Během této doby se organické rozpouštědlo odpařuje a polymer tuhne na sférické částice. Výsledná mikrosuspenze se zfiltruje přes 250 µm síto pro případné oddělení aglomerátů. Izolace mikročástic je provedena kontinuální centrifugací (6 000 otáček/ min, po dobu 2 minut). Přebytečná voda se dekantuje a mikročástice jsou sesbírány na Petriho misky a jsou uloženy v mrazicím boxu při -20 °C. Zbývající voda je poté vysušena lyofilizací.



Obr. 4. Přístroje nezbytné k přípravě mikročástic: A) homogenizátor, B) mechanické hřídelové míchadlo, C) laboratorní vortex (Foto: J. Vysloužil).



Obr. 5. Vzhled finální násobné emulze při odpařování rozpouštědla (Foto: J. Vysloužil).

HORMONÁLNÍ STIMULACE SPERMIACE REOFILNÍCH DRUHŮ JESETERA MALÉHO A PARMÍČKY ŽRALOČÍ POMOCI PLGA MIKROČÁSTICOVÝCH SYSTÉMŮ S ŘÍZENÝM UVOLŇOVÁNÍM GONADOLIBERINU

2.5. Doporučené dávkování PLGA mikročasticových systémů s řízeným uvolňováním mGnRH_a

Optimální výše dávky PLGA mikročasticových systémů indukujících zvýšenou spermiaci modelových druhů reofilních ryb se pohybuje v rozmezí 10 až 35 µg mGnRH_a (8 až 30 mg PLGA mikročastic) na 1 kg hmotnosti ošetřené ryby. K uvolnění 95 % účinné látky dojde do 72 h po aplikaci (Obr. 7).

2.6. Forma aplikace PLGA mikročasticových systémů s řízeným uvolňováním

Prvním krokem je příprava suspenze PLGA mikročasticových systémů s fyziologickým roztokem (0,9% NaCl). Dle sumární váhy ošetřovaných ryb je naváženo na analytických vahách příslušné množství PLGA mikročastic, které je krátce před aplikací naředěno fyziologickým roztokem. Při ředění PLGA mikročastic doporučujeme zachovávat poměr 1 ml léčebné suspenze na 1 kg ryb u kusové hmotnosti ošetřovaných jedinců ≤ 2 kg. U kusové hmotnosti ryb nad 2 kg je vhodnější poměr 0,5 ml léčebné suspenze na 1 kg ryb. Připravenou léčebnou suspenzi je potřebné těsně před aplikací rybám důkladně homogenizovat pomocí vortexu (Obr. 6), aby se zamezilo sedimentaci PLGA mikročastic na dně kádinky (Obr. 7). Pro injekci suspenze je vhodné využívat jehly o průměru 1,2 mm (růžová barva) (Obr. 7), které umožňují lehký průchod PLGA mikročastic a zabraňují sedimentaci v hrdle jehly. Aplikace léčebné suspenze se provádí buď do oblasti břišní dutiny – intraperitoneální aplikace (výhodnější u samic), nebo do oblasti hřbetní svaloviny – intramuskulární aplikace (výhodnější u samců).



Obr. 6 a 7. Homogenizace PLGA mikročastic s fyziologickým roztokem pomocí mobilního vortexu, krátce před injekční aplikací pomocí 1,2mm hrubé injekční jehly s injekční stříkačkou (Foto: J. Knowles).

2.7. Příprava reofilních druhů ryb před umělým výtěrem spermatu

Gametogeneze a finální zrání gamet je regulováno kaskádou hormonů podél reprodukční osy „hypotalamus – hypofýza – gonády“, citlivě reagujících a konstantně vyhodnocujících celou plejádu exogenních a endogenních stimulů. Za předpokladu výběru generačních samců v optimálním zdravotním stavu je z hlediska úspěšné hormonální stimulace potřebné navození vhodné před-výtěrové environmentální přípravy. Znalost a přiblížení se k neoptimálnější možné konstelaci přirozeně se vyskytujících exogenních faktorů výtěrového prostředí sice ve většině případů nestačí na odstranění reprodukční dysfunkce, ale je bezpodmínečně nutná z důvodu aktivace endokrinního systému ryb vedoucího k nabytí schopnosti (např. aktivace steroidogenézy v gonádách, zvýšení počtu GnRH a LH receptorů) pozitivně reagovat na podanou hormonální léčbu.

Pro ilustraci uvádíme nezbytnou environmentální před-výtěrovou přípravu reofilních druhů ryb využitých pro přípravu předložené metodiky. Samcům jesetera malého držným v před-výtěrovém období při teplotě vody do 10 °C je postupně navyšována teplota vody (maximální denní nárůst o 1 °C) na finální hodnotu 14–15 °C. Tato teplota je udržována alespoň 5 dní před plánovanou hormonální stimulací. V případě samců nepůvodního druhu parmičky žraločí je potřebné minimálně 4 až 6 týdnů před plánovaným umělým výtěrem spermatu udržovat teplotu vody na úrovni 26–27 °C, což je teplota vody typická pro období dešťů v lokalitě výskytu tohoto druhu (Obr. 8).

HORMONÁLNÍ STIMULACE SPERMIACE REOFILNÍCH DRUHŮ JESETERA MALÉHO A PARMIČKY ŽRALOČÍ POMOCÍ PLGA MIKROČÁSTICOVÝCH SYSTÉMŮ S ŘÍZENÝM UVOLŇOVÁNÍM GONADOLIBERINU



Obr. 8. Akvárium se samci pamičky žraločí v předvýtěrové přípravě (Foto: P. Podhorec).

2.8. Odběr spermatu

Před samotným odběrem spermatu je potřebné osušit oblast urogenitální papily a eliminovat možnou kontaminaci odebíraného spermatu vodou nebo tělními tekutinami. V případě manipulace s citlivými druhy reofilních ryb je vhodné využití účinné anestezie (Obr. 9). V případě pamičky žraločí bylo kvůli kontaminaci močí sperma odebíráno injekční stříkačkou obsahující 2,5 ml imobilizačního roztoku (180 mM NaCl, 2,8mM KCl, 1,36mM CaCl₂ 2H₂O a 2,38 mM NaHCO₃). V případě jesetera malého bylo sperma odebíráno pomocí kanyly vhodného průměru (jesetera malého 4–5 mm), a to pouhým vycévkováním do sběrné nádobky (Obr. 10).



Obr. 9. Anestezie samců pamičky žraločí (Foto: P. Podhorec).

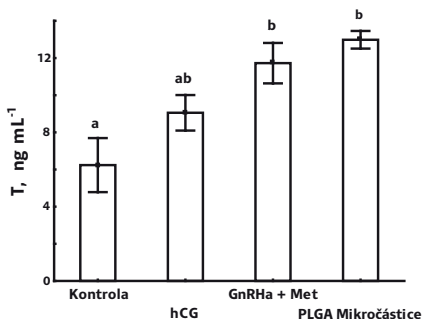


Obr. 10. Odběr spermatu jesetera malého (Foto: P. Šablatura).

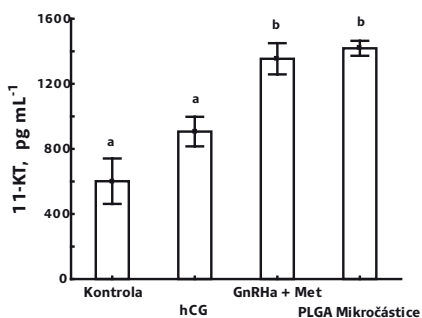
2.9. Hormonální odezva rybího organismu po ošetření PLGA mikročásticovým systémem s řízeným uvolňováním mGnRHa

V přirozeném prostředí volných vod dochází v předvýtěrové a výtěrové periodě u samic ryb k významnému nárůstu hodnot LH v krvi mající za následek intenzivní stimulaci produkce samčích pohlavních steroidů (androgenů) ve varlatech. Androgeny 11-ketotestosteron (11-KT) a testosteron (T) (Koya a kol., 2003) se podílejí na regulaci celého procesu spermiogeneze a ve zvýšené míře se objevují i během finálních fází zrání spermatu u celé plejády významných druhů ryb (Mañanós a kol., 2008; Mylonas a kol., 2010). Monitoring koncentrace 11-KT a T v krvi ošetřených ryb je proto významným ukazatelem pro vyhodnocení síly efektu hormonálního preparátu na rybí organismus. Aplikace PLGA mikročásticových systémů vedla u modelových druhů reofilních ryb k nárůstu koncentrace významných androgenů (11-KT a T) s dosaženými hodnotami uvedenými v Obr. 11–14.

HORMONÁLNÍ STIMULACE SPERMIACE REOFILNÍCH DRUHŮ JESETERA MALÉHO A PARMÍČKY ŽRALOČÍ POMOCÍ PLGA MIKROČÁSTICOVÝCH SYSTÉMŮ S ŘÍZENÝM UVOLŇOVÁNÍM GONADOLIBERINU



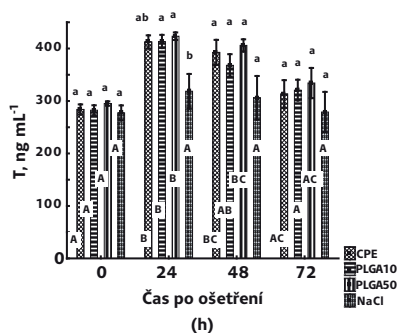
Obr. 11. Koncentrace testosteronu v krevní plazmě samců parmičky žraločí 24 h po aplikaci hormonálního ošetření: Kontrola – 0,9% NaCl, hCG – 500 I.U., GnRHa + Met - mGnRHa (25 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) + Metoklopramid (20 mg.kg^{-1}), PLGA mikročástice – 8,3mg (10 $\mu\text{g.kg}^{-1}$). Data jsou prezentována jako průměr (sloupec) a směrodatná odchylka (chybová úsečka). Signifikantní rozdíly koncentrace mezi skupinami jsou označeny malými písmeny ($P < 0,05$).



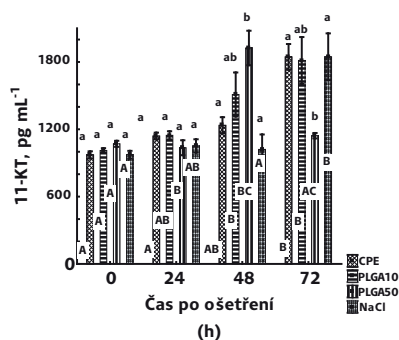
Obr. 12. Koncentrace 11-ketotestosteronu v krevní plazmě samců parmičky žraločí 24 h po aplikaci hormonálního ošetření: Kontrola – 0,9% NaCl, hCG – 500 I.U., GnRHa + Met - mGnRHa (25 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) + Metoklopramid (20 mg.kg^{-1}), PLGA mikročástice – 8,3mg (10 $\mu\text{g.kg}^{-1}$). Data jsou prezentována jako průměr (sloupec) a směrodatná odchylka (chybová úsečka). Signifikantní rozdíly koncentrace mezi skupinami jsou označeny malými písmeny ($P < 0,05$).

Z uvedených dat je patrný signifikantně vyšší účinek PLGA mikročasticového systému indukovat produkci androgenů (11-KT a T) u samců parmičky žraločí, nežli je tomu u kontroly nebo po aplikaci humánního choriogonadotropinu. Navzdory odběru vzorků relativně krátce po aplikaci preparátů (24 h) nebyl nalezen žádný rozdíl v koncentracích androgenů stimulovanými PLGA

mikročasticovým systémem s postupným uvolňováním mGnRHa versus akutně působící preparát mGnRHa s metoklopramidem.



Obr. 13. Koncentrace testosteronu v krevní plazmě samců ješetera malého po aplikaci hormonálních ošetření: CPE – kapří hypofýza (4 mg.kg^{-1}), PLGA 10 – $8,3 \text{ mg PLGA}$ mikročastic ($35 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}$), PLGA 50 – 165 mg PLGA mikročastic ($200 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}$), NaCl – $0,9\%$ NaCl. Data jsou prezentována jako průměr (sloupec) a směrodatná odchylka (chybová úsečka). Signifikantní rozdíly koncentrace mezi skupinami jsou označeny malými písmeny ($P < 0,05$), signifikantní rozdíly koncentrace v rámci skupiny mezi jednotlivými odběrnými místy v čase jsou označeny velkými písmeny ($P < 0,05$).



Obr. 14. Koncentrace 11-ketotestosteronu v krevní plazmě samců ješetera malého po aplikaci hormonálních ošetření: CPE – kapří hypofýza (4 mg.kg^{-1}), PLGA 10 – $8,3 \text{ mg PLGA}$ mikročastic ($35 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}$), PLGA 50 – 165 mg PLGA mikročastic ($200 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}$), NaCl – $0,9\%$ NaCl. Data jsou prezentována jako průměr (sloupec) a směrodatná odchylka (chybová úsečka). Signifikantní rozdíly koncentrace mezi skupinami jsou označeny malými písmeny ($P < 0,05$), signifikantní rozdíly koncentrace v rámci skupiny mezi jednotlivými odběrnými místy v čase jsou označeny velkými písmeny ($P < 0,05$).

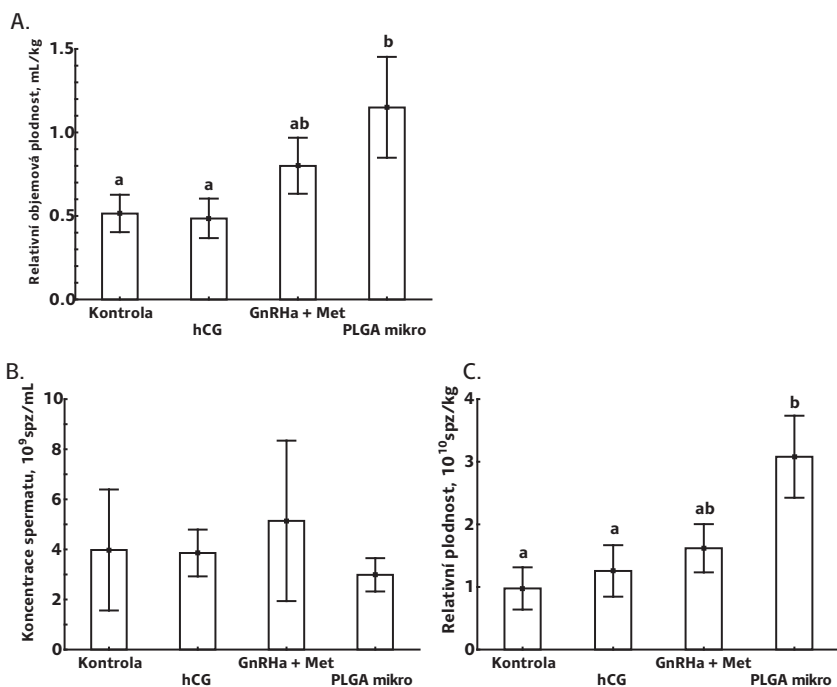
HORMONÁLNÍ STIMULACE SPERMIACE REOFILNÍCH DRUHŮ JESETERA MALÉHO A PARMÍČKY ŽRALOČÍ POMOCI PLGA MIKROČÁSTICOVÝCH SYSTÉMŮ S ŘÍZENÝM UVOLŇOVÁNÍM GONADOLIBERINU

Aplikace PLGA mikročasticového systému vyvolala významné zvýšení hodnot testosteronu 24 h po aplikaci ve srovnání s kontrolní skupinou, s následným poklesem hodnot. V případě hodnot 11-ketotestosteronu došlo k postupnému nárůstu koncentrací u všech experimentálních skupin se zaznamenaným poklesem u PLGA50 72h po aplikaci.

2.10. Kvantitativní parametry odebraného spermatu po ošetření PLGA mikročasticovým systémem s řízeným uvolňováním mGnRHa

Pozitivní efekt PLGA mikročasticového systému s řízeným uvolňováním mGnRHa je v případě samců testovaných reofilních ryb představovaný zvýšenou sekrecí endogenního LH z adenohipofýzy s následnou stimulací steroidogeneze, projevující se nárůstem objemu seminální plazmy a hydratací varlat. Zvýšený objem seminální plazmy ve varlatech umožňuje výtěr již zralých spermií a jejich následný odběr na vyústění semenného traktu – urogenitální papile. Aplikace PLGA mikročasticového systému vedla u modelových druhů reofilních ryb k dosažení následovných parametrů (Obr. 15–20).

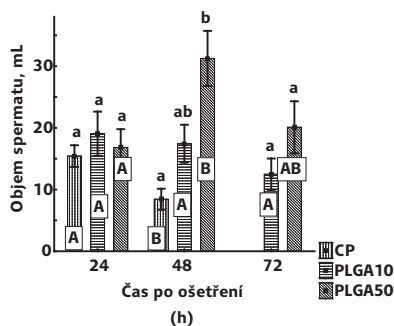
Jako jediné z testovaných hormonálních ošetření vedla aplikace PLGA mikročasticového systému u parmičky žraločí k signifikantnímu zvýšení objemu spermatu a celkové koncentrace spermií v porovnání s kontrolní skupinou (0,9% NaCl). Standardní ošetření humánním choriogonadotropinem nebo kombinací mGnRHa s metoklopramidem nevedlo k dosažení lepších výsledků u žádného kvantitativního parametru spermatu než u výsledků po aplikaci fyziologického roztoku (kontrolní skupina). Předložené výsledky poukazují na to, že dlouhodobější (24 h), kontrolované uvolňování nižších dávek mGnRHa je schopné efektivně překonat dopaminní inhibici LH sekrece, typickou pro zástupce řádu máloostní (Cypriniformes) a efektivně indukovat zvýšenou spermiaci ošetřeného reofilního druhu.



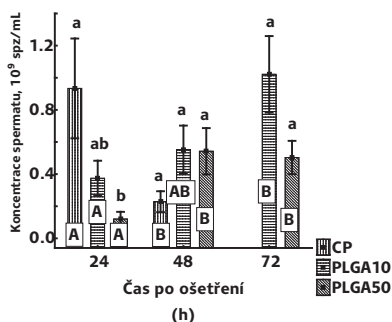
Obr. 15–17. Parametry spermatu parmičky žraločí, odebrané 24 h po aplikaci PLGA mikročástic: A – Relativní objemová plodnost samce, B – Koncentrace spermií ve spermatu, C – Relativní plodnost samce. Kontrola – 0,9% NaCl, hCG – 500 I.U hCG., GnRha + Met – ($25 \mu\text{g.kg}^{-1}$) mGnRHa + Metoklopramid (20mg.kg^{-1}), PLGA mikro – 8,3 mg ($10 \mu\text{g.kg}^{-1}$) PLGA mikročástice. Data jsou prezentována jako průměr (sloupec) a směrodatná odchylka (chybová úsečka). Signifikantní rozdíly koncentrace mezi skupinami jsou označeny malými písmeny ($P < 0,05$).

HORMONÁLNÍ STIMULACE SPERMIACE REOFILNÍCH DRUHŮ JESETERA MALÉHO A PARMÍČKY ŽRALOČÍ POMOCÍ PLGA MIKROČÁSTICOVÝCH SYSTÉMŮ S ŘÍZENÝM UVOLŇOVÁNÍM GONADOLIBERINU

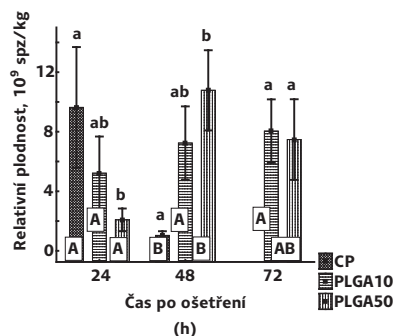
A.



B.



C.



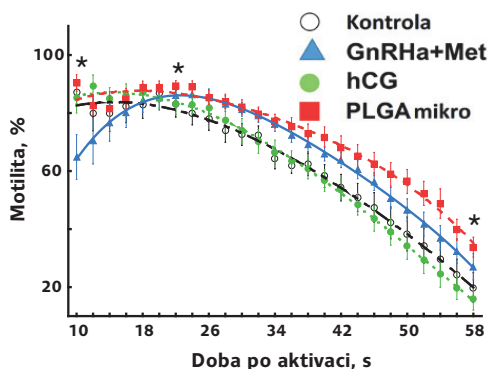
Obr. 18–20. Parametry spermatu jesetera malého v průběhu experimentu: A – Objem spermatu, B – Koncentrace spermií ve spermatu, C – Relativní plodnost samce. CPE – kapří hypofýza (4 mg.kg⁻¹), PLGA 10 – 8,3 mg PLGA mikročásteček (35 μg.kg⁻¹), PLGA 50 – 165 mg PLGA mikročásteček (200 μg.kg⁻¹). Data jsou prezentována jako průměr (sloupec) a směrodatná odchylka (chybová úsečka). Signifikantní rozdíly koncentrace mezi skupinami jsou označeny malými písmeny ($P < 0,05$), Signifikantní rozdíly koncentrace v rámci skupiny mezi jednotlivými odběrnými místy v čase jsou označeny velkými písmeny ($P < 0,05$).

Předložená data poukazují na významné prodloužení doby odběru spermatu a možnosti získání signifikantně většího množství spermatu jesetera malého po aplikaci PLGA mikročásteček, nežli je tomu po podání standardního ošetření kapří hypofýzou. Na základě získaných dat se ukázala být stimulace pomocí mGnRHa (35 μg.kg⁻¹) uvolňovaného z PLGA mikročásteček jako nejúčinnější ošetření. Po aplikaci této koncentrace bylo dosaženo vyrovnané produkce spermatu během celé doby pokusu, přičemž se kvantitativní parametry spermatu signifikantně neodlišují od hodnot zaznamenaných 24 h po aplikaci

kapří hypofýzy a zároveň se významně neliší od hodnot za 48 h a 72 h po aplikaci výrazně vyšší dávky mGnRHa dodané pomocí PLGA mikročásticového systému.

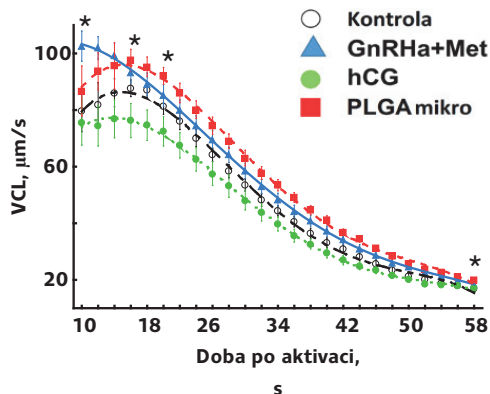
2.11. Kvalitativní parametry odebraného spermatu po ošetření PLGA mikročásticovým systémem s řízeným uvolňováním mGnRHa

Mezi základní kvalitativní charakteristiky odebraného spermatu ryb patří podíl pohyblivých spermií – motilita (%) a rychlost pohybu spermií ($\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$). Zlepšení kvalitativních charakteristik spermatu pomocí hormonální terapie je náročným úkolem a dochází k němu ve výrazně menší míře, nežli je tomu v případě kvantitativních charakteristik (Mylonas a kol., 2017). Aplikace PLGA mikročásticových systémů modelovým druhům reofilních ryb však vedla i ke statisticky významnému zlepšení motility a rychlosti pohybu spermií. Dosažené parametry spermatu po ošetření jsou uvedeny v následujících Obr. 21–24.



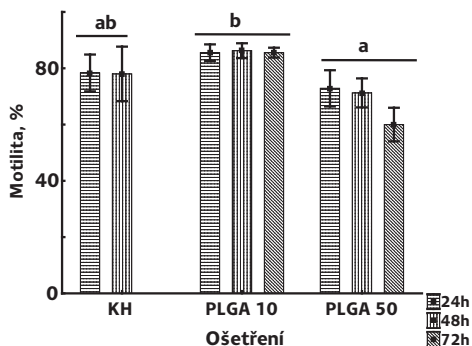
Obr. 21. Průběh motility spermií pamičky žraločí po aktivaci pohyblivosti. Data jsou prezentována jako průměr a směrodatná odchylka (chybová úsečka). Kontrola – 0,9% NaCl, hCG – 500 I.U., GnRHa + Met – mGnRHa ($25 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) + Metoklopramid ($20 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), PLGA mikro – PLGA mikročástice – $8,3 \text{mg}$ ($10 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$).

HORMONÁLNÍ STIMULACE SPERMIACE REOFILNÍCH DRUHŮ JESETERA MALÉHO A PARMÍČKY ŽRALOČÍ POMOCI PLGA MIKROČÁSTICOVÝCH SYSTÉMŮ S ŘÍZENÝM UVOLŇOVÁNÍM GONADOLIBERINU

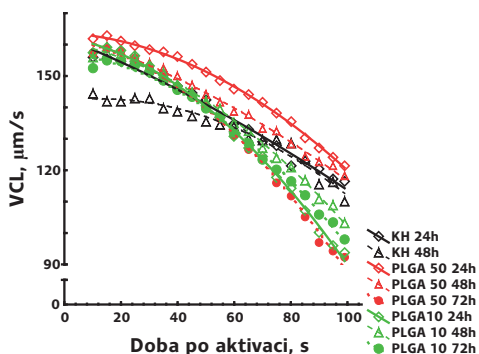


Obr. 22. Křivočarý průběh rychlosti (VCL, $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) pohybu spermií pamičky žraločí po aktivaci. Kontrola – 0,9% NaCl, hCG – 500 I.U., GnRH + Met – mGnRH (25 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) + Metoklopramid (20 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), PLGA mikro – PLGA mikročástice – 8,3mg (10 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$).

Aplikace PLGA mikročásticového systému s řízeným uvolňováním mGnRH vedla u pamičky žraločí k statisticky významnému zvýšení procenta pohyblivých spermií (motilita) v porovnání s kontrolou (0,9% NaCl) a aplikací hCG přípravku. V porovnání PLGA s ošetřením mGnRH s metoklopramidem nebyl zjištěn žádný rozdíl v kvalitativních parametrech.



Obr. 23. Motilita spermií jesetera malého (10 s po aktivaci pohyblivosti) po třech typech hormonálního ošetření: KH – kapří hypofýza (4 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), PLGA 10 – 8,3mg PLGA mikročástic (35 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$), PLGA 50 – 165mg PLGA mikročástic (200 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$). Data jsou prezentována jako průměr a směrodatná odchylka (chybová úsečka). Signifikantní rozdíly mezi skupinami jsou označeny malými písmeny ($P < 0,05$).



Obr. 24. Křivočarý průběh rychlosti ($\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) pohybu spermií jesetera malého po aktivaci pohybu. KH – kapří hypofýza ($4\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), PLGA 10 – $8,3\text{ mg}$ PLGA mikročásteček ($35\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$), PLGA 50 – 165 mg PLGA mikročásteček ($200\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$).

Aplikace PLGA mikročástečkového systému s řízeným uvolňováním mGnRHa ($35\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) stimuluje u jesetera malého signifikantně vyšší rychlost pohybu spermií v porovnání se standardním ošetřením kapří hypofýzou a signifikantně vyšší motilitu nežli dávka $200\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ mGnRHa aplikovaná pomocí PLGA mikročástečkového systému.

2.12. Shrnutí

Aplikace PLGA mikročástečkového systému s řízeným uvolňováním mGnRHa vedla k významnému zlepšení kvantitativních a kvalitativních parametrů spermatu u testovaných druhů reofilních ryb. Vhodné rozpětí mGnRHa koncentrací uvolňujících se z PLGA mikročásteček je 10 až $35\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ mGnRHa. Za využití uvedených koncentrací mGnRHa dlouhodobě se uvolňujících z PLGA mikročásteček dochází k významně lepší stimulaci spermiace, než je tomu po standardních ošetřeních.

3. SROVNÁNÍ „NOVOSTI POSTUPŮ“

Využití PLGA mikročástečkového systému s řízeným uvolňováním mGnRHa je v stimulaci spermiace reofilních druhů ryb celosvětově velmi inovativním přístupem, umožňující produkci vysoce kvalitního spermatu po výrazně delší dobu, než je tomu po standardních ošetřeních typu kapří hypofýza nebo analog gonadoliberinu s antagonistem dopaminu.

HORMONÁLNÍ STIMULACE SPERMIACE REOFILNÍCH DRUHŮ JESETERA MALÉHO A PARMÍČKY ŽRALOČÍ POMOCI PLGA MIKROČÁSTICOVÝCH SYSTÉMŮ S ŘÍZENÝM UVOLŇOVÁNÍM GONADOLIBERINU

4. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Předložená metodika je určena pro chovatele věnující se problematice umělého výtěru ryb, konkrétně hormonální indukci spermiace s možným přesahem do oblasti hormonální stimulace ovulace ryb.

5. EKONOMICKÉ ASPEKTY

Ekonomické přínosy využití námi popsané metodiky jsou představovány například možnosti opakovaného výtěru málo početných samců cenných druhů reofilních ryb nebo eliminaci nutnosti využívání antagonistů dopaminu v reprodukci reofilních druhů ryb.

Vpřípadě modelové kalkulace se například získáním možnosti vícenásobného využití spermatu u samců cenného druhu jesetera blíží potenciální zisk ve výši desetitisíců českých korun.

6. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

- Alavi, S.M.H., Hatef, A., Mylonas, C.C., Gela, D., Papadaki, M., Rodina, M., Kaspar, V., Psenicka, M., Podhorec, P., Linhart, O., 2012. Sperm characteristics and androgens in *Acipenser ruthenus* after induction of spermiation by carp pituitary extract or GnRHa implants. *Fish Physiol Biochem* 38 (6): 1655–1666.
- Han, F.Y., Thurecht, K.J., Whittaker, A.K., Smith, M.T., 2016. Bioerodable PLGA-based microparticles for producing sustained-release drug formulations and strategies for improving drug loading. *Frontiers in Pharmacology* 7: 185.
- Koya, Y., Watanabe, H., Soyano, K., Ohta, K., Aritaki, M., Matsubara, T., 2003. Testicular development and serum steroid hormone levels in captive male spotted halibut *Verasper variegatus*. *Fisheries Science* 69 (4): 792–798.
- Lengyel, M., Kallai-Szabo, N., Antal, V., Laki, A.J., Antal, I., 2019. Microparticles, microspheres, and microcapsules for advanced drug delivery. *Scientia Pharmaceutica* 87 (3): 20.
- Linhart, O., Peter, R.E., Rothbard, S., Zohar, Y., Kvasnicka, P., 1995. Spermiation of common tench (*Tinca-tinca* L.) stimulated with injection or implantation of GnRh analogs and injection of carp pituitary extract. *Aquaculture* 129 (1–4): 119–121.
- Mañanós, E., Duncan, N., Mylonas, C., 2008. Reproduction and control of ovulation, spermiation and spawning in cultured fish. In: Cabrita, E., Robles, V., Herráez, P. (Eds), *Methods in reproductive aquaculture. Marine and freshwater species*. CRC Press, pp. 3–80.
- 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 (4): 463–491.

- Mylonas, C.C., Scott, A.P., Vermeirssen, E.L.M., Zohar, Y., 1997. 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 (3): 669–675.
- Mylonas, C.C., Fostier, A., Zanuy, S., 2010. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *General and Comparative Endocrinology* 165 (3): 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.
- Podhorec, P., Kouril, J., 2009. Induction of final oocyte maturation in Cyprinidae fish by hypothalamic factors: a review. *Veterinarni Medicina* 54 (3): 97–110.
- Radinová, E., 2021. Reprodukovatelnost přípravy mikročásteč s obsahem alarelinu a příprava vzorků mikročásteč s obsahem leuprorelinu a kumarinu. Diplomová práce, Masarykova univerzita, Brno, 114 s.
- 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 GnRH_a implants. *Aquaculture* 219 (1–4): 873–890.
- Yaron, Z., Bogomolnaya, A., Drori, S., Biton, I., Aizen, J., Kulikovskiy, Z., Levavi-Sivan, B., 2009. Spawning induction in the carp: Past experience and future prospects – a review. *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh* 61 (1): 5–26.
- Zohar, Y., Mylonas, C.C., 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture* 197 (1–4): 99–136.
- Zohar, Y., Goren, A., Tosky, M., Pagelson, G., Leibovitz, D., Koch, Y., 1989. The bioactivity of gonadotropin-releasing hormones and its regulation in the gilthead seabream, *Sparus aurata* – *in vivo* and *in vitro* studies. *Fish Physiology Biochemistry* 7 (1–6): 59–67.

7. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

- Podhorec, P., Knowles, J., Vysloužil, J., Boryshpolets, S., Kubová, K., Rodina, M., Kholodnyy, V., Sotnikov, A., Gela, D., Dzyuba, B., 2021. Induction of spermiation in sterlet *Acipenser ruthenus* by PLGA microparticle delivery with sustained alarelin release. *Animals* 11 (11): 3305.
- Podhorec, P., Knowles, J., Vysloužil, J., Boryshpolets, S., Sotnikov, A., Holická, M., Kouřil, J., Dzyuba, B., 2021. Hormone induction of spermiation in tropical cyprinid bala shark *Balantiocheilos melanopterus*. *Fishes* (in press)

Dedikace

Výsledky byly získány za finanční podpory NAZV č. QK1920326 s názvem „Akvakultura reofilních druhů ryb“ (100 %).