



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

Využití přípravků na bázi mikročástic s hormonální substancí v akvakultuře

J. Knowles, J. Vysloužil, P. Podhorec



ISBN 978-80-7514-144-6





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

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

Využití přípravků na bázi mikročástic s hormonální substancí v akvakultuře

J. Knowles, J. Vysloužil, P. Podhorec

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:**

„Technologie VII“ č. CZ.10.5.109/5.2/4.0/20_017/0001093

**Obsahová část publikace byla zpracována za finanční podpory následujících
projektů:**

*NAZV projekt č. QK1810221 – Využití mikročástic jako nosičů hormonálně
aktivních látek v řízené reprodukci ryb (100 %)*



č.191

ISBN 978-80-7514-144-6

OBSAH

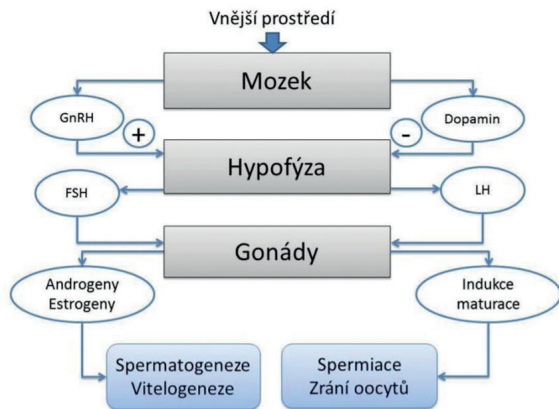
1.	ÚVOD DO PROBLEMATIKY	7
1.1.	Hormonální regulace reprodukce	7
1.2.	Reprodukční dysfunkce	8
1.3.	Techniky hormonální stimulace	9
1.3.1.	Přípravky první generace	9
1.3.2.	Přípravky druhé generace	10
1.3.3.	Řízené uvolňování GnRHa	12
1.4.	PLGA mikročástice	13
2.	CÍL	14
3.	MÍSTO OVĚŘENÍ TECHNOLOGIE	14
4.	POPIS TECHNOLOGIE A VÝSLEDKY	14
4.1.	Formace PLGA mikročástic	14
4.2.	Příprava a aplikace testovaných preparátů	17
4.3.	Hodnocení kvality spermatu	17
4.4.	Analýza pohlavních steroidů	18
4.5.	Statistické hodnocení	19
4.6.	Technologické postupy u jednotlivých druhů ryb	20
4.6.1.	Sih peleď (<i>Coregonus peled</i>)	20
4.6.2.	Štika obecná (<i>Esox lucius</i>)	26
4.6.3.	Candát obecný (<i>Sander lucioperca</i>)	34
4.6.4.	Okoun říční (<i>Perca fluviatilis</i>)	40
5.	EKONOMICKÝ PŘÍNOS	46
6.	UPLATNĚNÍ TECHNOLOGIE V PRAXI	46
7.	SEZNAM LITERATURY	46

1. ÚVOD DO PROBLEMATIKY

1.1. Hormonální regulace reprodukce

Reprodukční cyklus je regulován kaskádou hormonů z tzv. reprodukční osy (mozek-hypofýza-gonády). V této ose jsou klíčovými regulátory hypofyzární gonadotropiny (GTH), jako jsou folikuly stimulující hormon (FSH) a luteinizační hormon (LH). Sekrece těchto dvou hormonů je řízena mozkem za pomoci stimulačního působení gonadotropin uvolňujícího hormonu (GnRH; z angl. *gonadotropin-releasing hormone*; Cabrita a kol., 2008). GnRH je neuropeptid, který je uvolňován z mozku v situacích, kdy jsou environmentální podmínky vyhodnoceny jako vhodné k reprodukci. GnRH působí přímo na hypofýzu a navozuje sekreci FSH a LH, které se uvolňují do krevního řečiště a působí na pohlavní žlázy, kde podněcují syntézu steroidních hormonů, které jsou hlavními stimulanty vývoje pohlavních žláz (Mylonas a Zohar, 2007). Antagonisticky vůči působení GnRH a zároveň inhibičně ve vztahu k sekreci LH působí Dopamin (DA), který zabraňuje předčasnému dozrávání gamet nebo jejich dozrávání v nepříznivých podmínkách (Peter a Yu, 1997).

V počátečních fázích gametogeneze GTH indukují sekreci androgenů, jako je testosteron a 11-keto testosteron (11-KT) u mlíčáků a estrogen 17 β -estradiol (E2) u jikernaček. Tyto hormony společně s FSH kontrolují následnou spermatogenezi a vitelogenezi. Toto období je charakterizováno vysokými hladinami FSH v krvi a zvyšujícími se hladinami testosteronu 11-KT u mlíčáků a E2 u jikernaček. Na konci gametogeneze sekrece LH z hypofýzy indukuje za pomoci sekrece steroidů finální zrání (MIS; z angl. *maturation inducing steroid*) gamet. Toto období je charakteristické snížením hladiny FSH a steroidů v krvi a zvýšením LH a MIS. Jakmile je zrání gonád dokončeno, GnRH stimuluje rapidní sekreci LH z hypofýzy, který indukuje ovulaci u jikernaček. U mlíčáků je spermiace vyvolána relativně stabilním a oproti mimovýtěrovému období jen nepatrně zvýšenými hladinami LH (Peter a Yu, 1997). Endokrinní řízení ovulace a spermiace je schematicky znázorněno na Obr. 1.



Obr. 1. Zjednodušené schematické znázornění reprodukční osy ryb (upraveno podle Mylonas a kol., 2010).

1.2. Reprodukční dysfunkce

Při chovu ryb v akvakultuře dochází ke značným změnám okolních podmínek a díky tomu většina druhů vykazuje nějakou formu reprodukční dysfunkce (Fitzpatrick, 2012). Tyto dysfunkce závisí na druhu, a mohou se vyskytovat v různé formě, a to od úplné absence tření až po snížení kvality produkovaných gamet. U mlíčáků lze velmi často pozorovat snížený objem spermatu, nízkou pohyblivost spermií, rychlosti pohybu či koncentrace spermií (Cejko a kol., 2018). V prostředí akvakultury ovšem vykazují většinou závažnější reprodukční dysfunkce jikernačky. Nezávažnějším typem reprodukční dysfunkce u jikernaček je inhibice vitelogeneze (ukládání velkého množství živin, které pak slouží k výživě embrya), kdy reprodukční cyklus nefunguje správně v žádném okamžiku. Druhým typem je inhibice procesu finálního zrání oocytů, kdy je vitelogeneze dokončena, ale postvitelogenní oocyty nejsou schopny projít finálním zráním. Tento druh reprodukční dysfunkce je poměrně běžný u většiny druhů ryb chovaných v akvakultuře. Posledním typem je absence samotné reprodukce. To znamená, že jikernačka prochází celým reprodukčním cyklem správně, ale dochází k absenci přirozeného tření. Všechny výše popsané dysfunkce jsou důsledkem několika faktorů, kterými jsou např. stres spojený s chovem v zajetí, absence signálů indukujících reprodukci a nevhodná výživa. Působení jednoho nebo kombinací těchto faktorů je základem úplné nebo částečné inhibice reprodukce (Mylonas a kol., 2010).

Negativní vliv stresu může být poměrně dobře minimalizován šetrnou, sporadickou manipulací a odpovídajícím welfare (intenzita světla a fotoperioda,

VYUŽITÍ PŘÍPRAVKŮ NA BÁZI MIKROČÁSTIC S HORMONÁLNÍ SUBSTANCÍ V AKVAKULTUŘE

velikost nádrže, přítok vody, výtěrový substrát, chemicko-fyzikální vlastnosti vody atd.) (Fitzpatrick, 2012). Obtížnější řešení ovšem nastává v případě absence signálů indukujících reprodukci. U mnoha druhů ryb je v provozních podmínkách téměř nemožné napodobit přirozené environmentální podmínky v době přirozeného rozmnožování. V každém případě, čím přirozenější podmínky jsou rybám poskytnuty, tím menší je riziko reprodukčních dysfunkcí (Cabrita a kol., 2008). V případě, že problémy s reprodukcí i nadále přetrvávají i po maximálním snížení výše uvedených parametrů, lze je překonat za použití hormonální stimulace.

1.3. Techniky hormonální stimulace

Aplikace a vývoj hormonální stimulace reprodukčních dysfunkcí umožnily umělou reprodukci mnoha druhů ryb. Byla zdokonalena umělá reprodukce, zlepšeny výtěrové postupy a technologicko-ekonomický úspěch akvakultury. V zásadě existují dvě situace, kdy dochází k používání hormonální stimulace. První je stimulace výtěru u druhů, které nepodstoupí finální zrání a druhou je synchronizace výtěrů, a tím zlepšení organizace práce na líhni (Mylonas a kol., 2010).

Hormonální ošetření generačních ryb lze rozdělit do třech hlavních skupin dle jejich působení na reprodukční osu. Přípravky první generace působí přímo na pohlavní žlázy, zatímco přípravky druhé generace působí na hypofýzu, a tak nepřímo ovlivňují pohlavní žlázu, čímž dochází ke komplexnější nápravě reprodukčních dysfunkcí (Zohar a Mylonas, 2001). Poslední skupinou jsou systémy pro dlouhodobé uvolňování GnRH α , mezi které patří například různé druhy implantátů či mikročastic. Uvolňování z těchto systémů může trvat několik dnů až týdnů, v závislosti na jejich druhu a teplotě okolního prostředí (Mylonas a kol., 1995).

1.3.1. Přípravky první generace

Hormonální přípravky první generace jsou obecně považovány za první přípravky použité ke stimulaci reprodukce ryb a zahrnují extrakty kapří hypofýzy a purifikované GTH. Velmi často je v podmínkách českých rybářských podniků používána metoda tzv. hypofyzace, kdy je rybám aplikován homogenát kapří hypofýzy připravený ve fyziologickém roztoku (Obr. 2, Kouřil a kol., 2020). Mezi výhody této metody se řadí jednoduchost způsobu získání hypofýzy a také její nízká cena. Hlavní nevýhodou ovšem představuje neznámý obsah aktivní složky (LH), který je vysoce variabilní v závislosti na rybě, ze které byla hypofýza odebrána (Arabaci a kol., 2004). Další nevýhodou je riziko imunní reakce, která může vzniknout při opakované aplikaci (Sukumasavin, 2008).

Druhou možností je využití extraktů kapří hypofýzy, kde je kalibrován obsah účinné složky. Nicméně i tyto extrakty si zachovávají nevýhody rizika vzniku imunní reakce a vysoký stupeň druhové specifity (Zohar a Mylonas, 2001).

Sofistikovanějším typem přípravků jsou purifikované či rekombinantní GTH. Jedná se o izolované LH a FSH ze savčí hypofýzy či lidský choriový gonadotropin (hCG) izolovaný z moči těhotných žen. GTH přípravky se používají k léčbě reprodukčních dysfunkcí pouze omezeně, kvůli složité izolaci GTH (Zohar a Mylonas, 2001). Oproti tomu hCG je hojně využíván v akvakultuře (Křišť'an a kol., 2013), navzdory jeho humánnímu původu, a to díky nízkým finančním nákladům, kalibraci účinné látky a dobré dostupnosti na trhu. Využití hCG má ovšem významnou nevýhodu, kterou je komplexní struktura jeho molekuly. hCG je velký a druhově specifický protein, který může způsobit imunitní odpověď, pokud je podáván jiným než savcím druhům (Rahdari a kol., 2014).

1.3.2. Přípravky druhé generace

Přípravky druhé generace zahrnují hormonální přípravky založené na bázi GnRH a dopaminu. Ve srovnání s přípravky z první generace má aplikace léčiv založených na GnRH významné výhody díky jeho působení na vyšší úrovni reprodukční osy. Tím dochází k podpoře více fyziologické stimulace celého reprodukčního procesu. Nevýhodou nativního GnRH je velmi krátký poločas rozpadu v krevním oběhu (Goren a kol., 1990), což způsobuje velmi často nedostatečnou stimulaci reprodukce. Z tohoto důvodu se výzkum zaměřil na tvorbu strukturně modifikovaných GnRH analogů (GnRH_a), které jsou více odolné enzymatickému štěpení a jsou velmi účinné v aktivaci GTH. Hormonální stimulace za použití GnRH_a má řadu výhod. Těmi jsou například jejich jednoduchá příprava, nízké produkční náklady a použitelnost pro širokou škálu zvířecích druhů, což je činí komerčně dobře dostupnými (Vazirzadeh a kol., 2011). Jedním z často používaných přípravků v českém rybářství je přípravek Supergestran (Obr. 3, Kouřil a kol., 2020). Hormonální stimulace za pomoci GnRH_a má ovšem svá omezení. Jedním z nich je stimulace uvolnění LH, která trvá jen 12–72 hodin, než účinek hormonální stimulace zmizí (Gothilf a Zohar, 1991). A v některých případech účinek pouze jedné injekce není dostatečný k vyvolání ovulace, a proto je nutná další injekce stimulující prodloužené uvolňování LH a ovulaci. Několikanásobné injekce jsou ovšem pro ošetřené organizmy stresující a mohou ústít až v úhyn generačních ryb (Fakriadis a kol., 2019).

VYUŽITÍ PŘÍPRAVKŮ NA BÁZI MIKROČÁSTIC S HORMONÁLNÍ SUBSTANCÍ V AKVAKULTUŘE



Obr. 2. Přípravek Ovopel (vlevo) a sušená kapří hypofýza (vpravo) zachycená v detailu pro porovnání struktury (Foto: J. Knowles).

Mezi přípravky druhé generace řadíme také antagonisty dopaminu, což jsou léky blokující inhibiční efekt dopaminu. Ne všechny ryby mají ovšem inhibiční systém dopaminu vyvinut. Silná produkce dopaminu je zaznamenána spíše u sladkovodních druhů ryb a slabá u druhů mořských (Aizen a kol., 2005). U ryb s aktivním dopamin systémem je inhibice ovulace a spermiace způsobena jak zvýšenou aktivitou dopaminu, tak sníženou aktivitou GnRH. Silná dopamin inhibice byla prokázána u kaprovitých, sumcovitých, lososovitých a některých druhů ostnoploutvých. U těchto ryb je většinou nutné ke stimulaci použít kombinované podání GnRHa a dopamin inhibitoru (Cabrita a kol., 2008). Na trhu je v současné době dostupných několik inhibitorů (pimozid, metoklopramid – Obr. 3, či domperidon) či přípravků kombinujících GnRHa a dopamin inhibitor, jako je například hojně používaný přípravek Ovopel (Obr. 2).



Obr. 3. Dopamin inhibitor metoklopramid a ampule přípravku Supergestran (Foto: J. Knowles).

1.3.3. Řízené uvolňování GnRH α

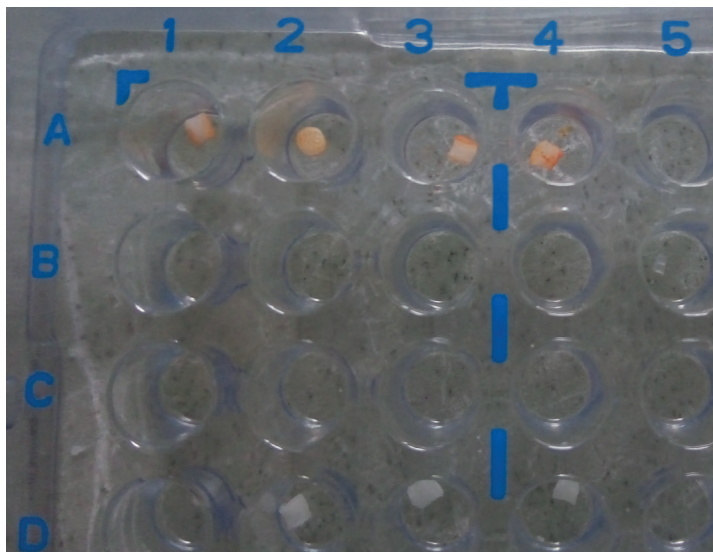
Řízené uvolňování GnRH α je velmi často nazýváno hormonálními přípravky třetí generace (Mylonas a Zohar, 2000). Kontrolované uvolňování GnRH α do krevního řečiště způsobuje dlouhodobou stimulaci produkce LH, jež může trvat až po dobu několika týdnů, v závislosti na druhu aplikačního systému a teplotě okolního prostředí (Mylonas a kol., 1995). K indukci ovulace a spermiace u ryb bylo úspěšně použito již mnoho různých druhů systémů pro kontrolované uvolňování léčiv. Mezi nejčastěji využívané pak patří například cholesterolové pelety, implantáty ethylen-vinyl-acetátu (EVAc) či mikrosféry (Agulleiro a kol., 2006; Guzmán a kol., 2009).

Prvním testovaným systémem pro kontrolované uvolňování GnRH α u ryb byly cholesterolové pelety. Uvolňování inkorporovaného GnRH α z těchto pelet trvá přibližně 28 dní (Weil a Crim, 1983). Navzdory některým nevýhodám, jako je například proměnlivost v uvolňování GnRH α mezi individuálními peletami, našly cholesterolové pelety rozsáhlé uplatnění, a to zejména v chovu lososovitých a mořských ryb (Ibarra-Castro a kol., 2017).

Dalším systémem pro postupné uvolňování jsou GnRH α implantáty EVAc (Brown a kol., 1986). GnRH α se z těchto implantátů může uvolňovat v rozmezí od 15 dní až po 5 týdnů. Délka uvolňování je závislá na jejich přípravě a mezi

VYUŽITÍ PŘÍPRAVKŮ NA BÁZI MIKROČÁSTIC S HORMONÁLNÍ SUBSTANCÍ V AKVAKULTUŘE

největší výhody patří jejich snadná výroba. Z jedné šarže je možné vyprodukovat až 500 implantátů, což signifikantně omezuje variabilitu obsahu GnRHa mezi jednotlivými implantáty (Zohar, 1996). EVAc systém (Obr. 4) je hojně používán zejména při indukci spermiace či ovulace mořských druhů ryb (Fakriadis a kol., 2017; Rahdari a Falahatkar, 2020; Saillant a kol., 2021).



Obr. 4. EVAc implantáty umístěné v mikrotitrační destičce (Foto: J. Knowles).

1.4. PLGA mikročástice

Mikročástice jsou běžně používanou složkou systémů pro dodávání účinných látek v humánním i veterinárním lékařství (Bale 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 těle a při případném selhání jedné jednotky nedochází k selhání celé dávky (Lengyel a kol., 2019).

Kopolymer kyseliny mléčné a glykolové (PLGA; z angl. *poly(lactic-co-glycolic acid)*) je jedním z nejvíce zkoumaných a univerzálních polymerů v biomedicíně inženýrství, a to zejména kvůli jeho vysoké biokompatibilitě a biologické odbouratelnosti *in vivo*. PLGA mikročástice jsou nejčastěji produkovány tzv. metodou odpaření rozpouštědla za využití dvojité emulze. Při této metodě je léčivo, které má být enkapsulováno, rozpuštěno ve vodě. Vodná fáze je dispergována v organickém rozpouštědle (dichlormetan), s příměsí

degradabilního polymeru a vzniká emulze voda₁/olej. Následné smíchání první emulze ve vodném médiu, potom vytváří konečnou dvojitou emulzi voda₁/olej/voda₂. Při následujícím odpařování se z rozpuštěného polymeru vytváří pevná matrice, jež do vlastní struktury uzavírá léčivo (Ruan a Feng, 2003).

2. CÍL

Cílem této ověřené technologie je popsat indukci ovulace a spermiace za použití PLGA mikročastic jako systému pro protražované uvolňování syntetického analogu savčího gonadotropin uvolňujícího hormonu (mGnRHa; z angl. *mammalian gonadotropin-releasing hormone analogue*). Tímto technologickým postupem byla ověřena 1) indukce a synchronizace ovulace a spermiace několika komerčně významných druhů ryb, 2) vliv hormonální stimulace na kvalitu a kvantitu získaných pohlavních produktů a 3) steroidní odezva generačních ryb na hormonální stimulace.

3. MÍSTO OVĚŘENÍ TECHNOLOGIE

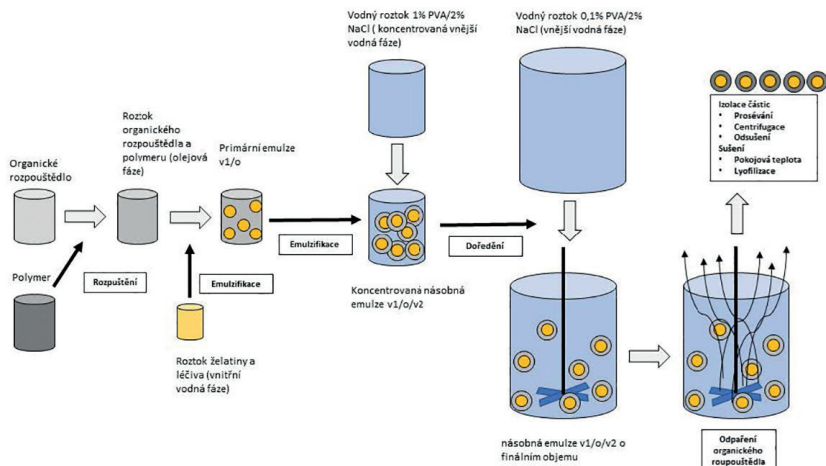
Ověření technologie probíhalo v několika nezávislých experimentech, které byly většinou provedeny na půdě Fakulty rybářství a ochrany vod, Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích (FROV JU). Další technologické postupy byly ověřovány v provozních podmínkách Štičí líhně ESOX v Táboře a na Rybí líhni Mydlovary.

4. POPIS TECHNOLOGIE A VÝSLEDKY

4.1. Formace PLGA mikročastic

Mikročastice použité ve všech experimentech byly připraveny metodou odpaření rozpouštědla z násobné emulze voda₁/olej/voda₂. Základní princip metody spočívá v odpaření těkavého organického rozpouštědla, ve kterém je rozpuštěný nebo dispergovaný polymer a účinná látka. Během odpařování se z polymeru formuje pevná sférická částice, která do své struktury uzavírá účinnou látku (Obr. 5). Jako léčivo byl zvolen alarelin, analog mGnRH. Stejně jako původní molekula GnRH je alarelin peptidové povahy a vyznačuje se vysokou rozpustností ve vodě. Jako nosičový materiál byl použit kopolymer kyseliny mléčné a glykolové ve dvou variantách: Resomer® 653 H (65 % polymléčné kyseliny, 35 % polyglykolové kyseliny) a Resomer® 753 (75 % polymléčné kyseliny, 25 % polyglykolové kyseliny), který se vyznačuje pomalejším profilem degradace.

VYUŽITÍ PŘÍPRAVKŮ NA BÁZI MIKROČÁSTIC S HORMONÁLNÍ SUBSTANCÍ V AKVAKULTUŘE



Obr. 5. Základní schéma přípravy mikročástic z násobné emulze metodou odpařování rozpouštědla (J. Vysloužil).

Prvním krokem je příprava jednotlivých fází. K přípravě olejové fáze bylo do širokohrdlé zkumavky odváženo 800 mg PLGA příslušného Resomeru® (Evonik, Německo) a zalito 5 g dichlormethanu (Penta, Česká republika). Obsah byl uzavřen zátkou ponechán samovolnému rozpouštění. Vnitřní vodná fáze byla připravena rozpouštěním želatiny v čištené vodě při 65 °C (10%; Sigma Aldrich, USA). Vnější vodná fáze byla tvořena dvěma různými roztoky, a sice předmíchávacím 1% roztokem polyvinil alkoholu (PVA; Sigma Aldrich, USA) a hlavní kontinuální vodnou fází o koncentraci PVA 0,1%. PVA je nutné rozpustit za zvýšené teploty (cca 90 °C) nejlépe den předem, aby roztok stačil vychladnout.

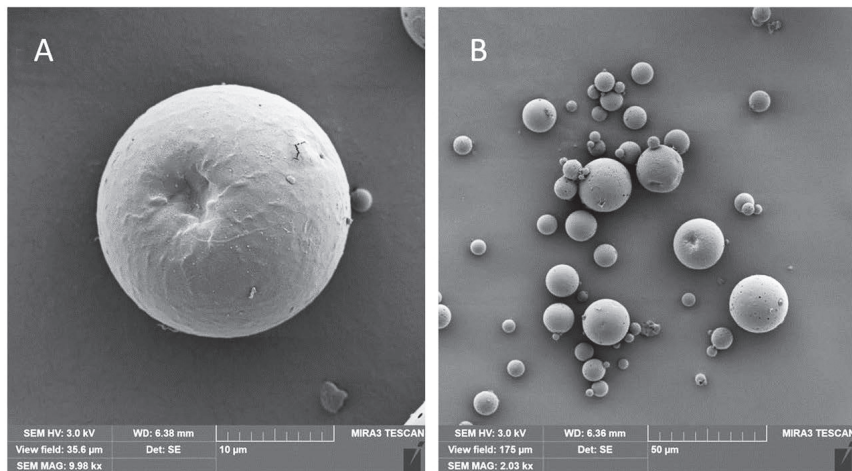
Dalším krokem je pak příprava emulze z jednotlivých fází a její další zpracování. Na analytických vahách bylo do mikrocentrifugační zkumavky naváženo 10 mg alarelinu a pomocí injekční stříkačky byl po okraj přidán 10% roztok želatiny (1,5 ml). Zkumavka s takto připraveným obsahem vnitřní vodné fáze byla vložena na vortex, pro řádné rozpuštění léčiva. Výsledný roztok byl následně nalit do širokohrdlé zkumavky s obsahem olejové fáze PLGA/dichlormethan (800 mg/5 g) a vše bylo opět promícháno na vortexu (30 s) k zajištění primární emulgace. Takto vznikla primární emulze voda₁/o. Ta byla následně promíchána po dobu 1 min za použití homogenizátoru (T25 basic, IKA-Werke, Německo), díky čemuž dispergovaná fáze získala mnohem menší velikost kapek a vznikla velmi jemná emulze. Posléze se do širokohrdlé zkumavky přidalo 12 g 1% roztoku PVA (koncentrovaná vnější vodná fáze k předmíchání) a opět za použití

homogenizátoru (1 min) vznikl koncentrovaný násobný emulzní systém voda₁/olej/voda₂. Ten byl následně dolit k doředění do větší kádinky s 200 ml 0,1% roztoku PVA s 2% obsahem NaCl (hlavní část kontinuální vnější vodné fáze). Obsah kádinky se pod dobu dvou hodin kontinuálně míchal pod hřídelovým míchadlem, které bylo nastaveno na 450 otáček/min (Obr. 6). Během této doby se odpaří organické rozpouštědlo a polymer tuhne ve sférické částice. Vzniklá mikrosuspenze byla přefiltrována přes síto o velikosti 250 μm pro případné oddělení aglomerátů. Izolace mikročastic byla provedena kontinuální centrifugací (6 000 otáček/min, 2 min). Veškerá nadbytečná voda byla slita a mikročastice byly sesbírány do Petriho misek a uloženy do mrazáku (-25 °C). Zbytek vody byl poté vysušen lyofilizací.



Obr. 6. *Přístrojové vybavení nezbytné pro přípravu PLGA mikročastic z násobné emulze metodou odpaření rozpouštědla; zleva: hřídelové míchadlo, homogenizátor, vortex (Foto: J. Vysloužil).*

Mikroskopickou analýzou bylo zjištěno, že připravené mikročastice mají vždy excelentní sfericitu (>0,99) a v rámci jednotlivých šarží se jejich průměrná velikost se pohybuje obvykle v intervalu 8,87–11,3 μm (SD max 5,2 μm). Obsah účinné látky v mikročasticích byl stanoven vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií vždy pro každou aktuální šarží. Mikročastice byly rozpuštěny v acetonu a výsledný roztok byl smíchán s fosfátovým pufrům o pH 7,0 v poměru 1 : 1. Pohled na mikročastice pod elektronovým mikroskopem je zaznamenán na Obr. 7.



Obř. 7. Fotografie z elektronového mikroskopu PLGA mikročářtice z Resomeru[®] 653 H; A) mikročářtice (měřítko 10 μ m), B) mikročářtice (měřítko 50 μ m) (Foto: J. Vysloužil).

4.2. Příprava a aplikace testovaných preparátů

Každý experiment zahrnující testování předloženého technologického postupu zahrnoval kontrolní skupinu. Kontrolním skupinám ve všech provedených testováních byl injekčně podán 0,9% fyziologický roztok v dávce 1ml.kg⁻¹.

PLGA mikročářtice byly v okamžiku aplikace homogenizované s 0,9% fyziologickým roztokem. Každá generační ryba byla injikována vzniklou homogenní suspenzí v dávce 1 ml.kg⁻¹ živé hmotnosti. Na základě zjištění autorů této technologie je výhodnější aplikace suspenze PLGA mikročářtice za použití jehly o průměru 1,2mm. Tento průměr jehly zajiřtuje omezení případné sedimentace mikročářtice v hrdle jehly. Ryby byly injikovány intraperitoneálně tak, aby bylo co nejvíce zamezeno úniku injikovaného preparátu z místa vpichu.

4.3. Hodnocení kvality spermatu

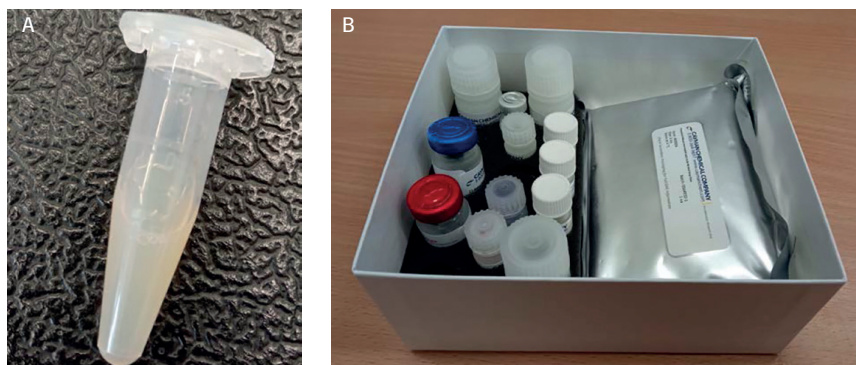
Motilita spermií byla hodnocena smícháním vzorků spermatu ~ 1 : 1 000 v aktivacním médiu (10 mM Tris pufr (pH 8,4) doplněným o 0,25% Pluronic[®] F-127 (Sigma-Aldrich, USA). Pro získání koncentrace 50–150 buněk v pozorovacím poli byly spermie přidány na mikroskopické sklíčko pomocí špičky injekční jehly a smíchány s 40 μ l aktivacního média. Videozáznamy byly pořízeny pomocí mikroskopu vybaveného digitální kamerou (PROiSER, Španělsko)

s kondenzátorem s negativním fázovým kontrastem a objektivem (10x) při rychlosti 25 snímků. s^{-1} po dobu jedné minuty. Videozáznamy byly analyzovány za účelem odhadu průměrné rychlosti spermií (VAP; z angl. *velocity average path*), křivočaré rychlosti (VCL; z angl. *curvilinear velocity*), přímé rychlosti (VSL; z angl. *straight-line velocity*) a procenta pohyblivých buněk pomocí softwaru ImageJ (National Institutes of Health, USA) a Plugin CASA (Wilson-Leedy a Ingermann, 2007; Purchase a Earle, 2012). Od každého mlíčka byly analyzovány tři vzorky spermatu.

Koncentrace spermatu byla hodnocena pomocí Bürkerovy komůrky. Sperma bylo zředěno (10 000x pro sperma štiky obecné a 200x pro sperma candáta obecného) ve fyziologickém roztoku, umístěno do komůrky a výpočet byl proveden do 5 minut. Od každého mlíčka byly analyzovány tři vzorky spermatu. Koncentrace spermatu je vyjádřena v miliardách. ml^{-1} .

4.4. Analýza pohlavních steroidů

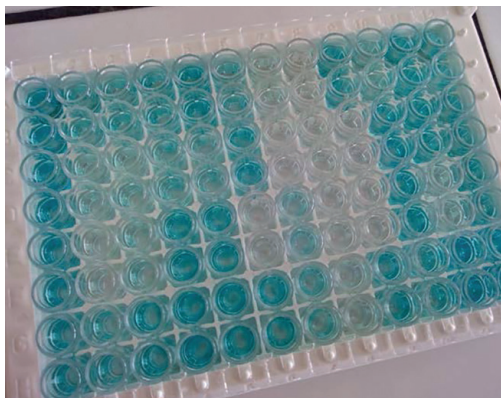
Analýza koncentrace hormonů v krevním řečišti poskytuje klíčové informace o odpovědi organismu na hormonální ošetření a umožňuje lépe porozumět fyziologickým změnám v průběhu reprodukce, což ulehčuje následný rozvoj a vývoj technologií pro indukci spermiace a ovulace. V průběhu experimentů byla rybám v pravidelných intervalech odebírána krev, ze které byla následně analyzována koncentrace testosteronu, 11-KT, E2. Odběr krve byl prováděn z ocasní cévy za použití předem heparinizované injekční stříkačky. Z odebrané krve byla následně odstředěna krevní plazma (5 000 rpm, 10 min, 10 °C; Obr. 6A), která byla poté přenesena do označených mikrozkušavek a uschována v mrazicím boxu (-80 °C) až do doby imunochemické analýzy.



Obr. 8. Odstředěná krevní plazma a speciální ELISA kit určený pro stanovení koncentrace E2 (Foto: J. Knowles).

VYUŽITÍ PŘÍPRAVKŮ NA BÁZI MIKROČÁSTIC S HORMONÁLNÍ SUBSTANCÍ V AKVAKULTUŘE

Imunochemická analýza je prováděna metodou zvanou ELISA (z angl. *enzyme-linked immuno sorbent assay*), která je široce rozšířena ke kvantitativnímu stanovení celé řady antigenů. Tato analytická metoda využívá vysoké imunochemické interakce mezi antigenem a protilátkou za přítomnosti specifického enzymu, který katalyzuje chemickou přeměnu substrátu. Výsledné koncentrace jsou stanovovány spektrofotometricky. Stanovení steroidních hormonů probíhalo v Laboratoři řízené reprodukce a intenzivního chovu ryb FROV JU. Analýza všech výše uvedených hormonů byla provedena na speciálních ELISA kitech (Obr. 8B), za využití 96jamkové mikrotitrační destičky. Stanovení steroidních hormonů (Obr. 9) probíhalo přesně podle manuálu výrobce, a to vždy ve dvou opakováních pro každý odebraný vzorek. V případě nutnosti byly jednotlivé vzorky ředěny 1 : 2 či 1 : 20 za použití speciálního kalibrátoru dle doporučení výrobce.



Obr. 9. Imunochemická analýza pohlavních steroidů za využití metody ELISA (Foto: J. Knowles).

4.5. Statistické hodnocení

Data byla analyzována dvoucestnou analýzou variance ANOVA. K určení signifikantních rozdílů mezi skupinami bylo využito Tukeyova testu (pro shodný počet pozorování ve všech skupinách) či Unequal N HSD testu (pro neshodný počet pozorování). Dosažení ovulace bylo testováno za pomoci neparametrického testu Kruskal-Wallis následovaného Dunnovým testem pro určení významnosti. Zvolená hladina významnosti v analýzách byla $p < 0,05$. Analýzy byly provedeny pomocí MS Excel pro Windows a softwaru Statistica 12 CZ (StatSoft). Všechna data jsou znázorněna jako průměr \pm směrodatná odchylka.

4.6. Technologické postupy u jednotlivých druhů ryb

K testování účinku PLGA mikročastic s enkapsulovaným GnRHa byly vybrány takové druhy, které reprezentují skupiny ryb běžně chované v podmínkách českého rybářství. Také byly zvoleny ryby obojího pohlaví tak, aby bylo možné zhodnotit efekt tohoto ošetření jak na produkci a kvalitu jiker, tak i na kvalitu a kvantitu získaného spermatu od mlíčáků.

4.6.1. Síh peled' (*Coregonus peled*)

Síh peled' se v průběhu několika desítek let stal důležitým druhem v intenzivní akvakultuře (Stejskal a kol., 2018; Matoušek a kol., 2020). Původně pochází z Ruska, ale byl úspěšně introdukovaný i do oblastí, jako je Bělorusko, Německo, Finsko, Lotyšsko, Estonsko a Česko (Gordeeva a kol., 2008). Peled' obvykle pohlavně dospívá ve dvou letech a přirozeně se vytírá v zimním období (listopad–leden), kdy teplota vody klesne pod 8 °C (Hanel a Lusk, 2005). Spontánní rozmnožování tohoto druhu může trvat i několik týdnů a v provozních podmínkách je nutné generační ryby často a pravidelně kontrolovat. Navíc teplota pod 2 °C může vyvolat hromadnou ovulaci jikernaček, což může způsobit organizační problémy na líhni (Hochman, 1987).

Pokud teplota vody klesne pod 2 °C, je možné k indukci a synchronizaci ovulace u peledě použít lososí nebo savčí GnRHa v jednorázové dávce 25 µg.kg⁻¹. K účinnější indukci ovulace (platí i pro vyšší teploty) dochází při aplikaci druhé dávky GnRHa, a to nejlépe 2–3 dny od první injekce (Svinger a Kouril, 2014). I přes dobrou účinnost dvou po sobě následujících dávek s sebou tato metoda nese vysoké riziko poranění a úhynu generačních ryb, a to zejména u choulostivých rybích druhů, ke kterým peled' bezpochyby patří (Švinger a Kouřil, 2012). Z přípravků s prodlouženým uvolňováním byla u síha úspěšně použita kombinace GnRHa a Freudova inkompletního adjuvancia (Svinger a Kouril, 2014). Nicméně tato metoda nenašla prozatím širšího komerčního uplatnění stejně tak jako aplikace GnRHa implantátů, které nejsou vhodné pro drobné a choulostivé ryby kvůli nutnosti použití širokých implantačních jehel.

Cílem tohoto experimentu bylo porovnat účinnost dvou typů mikročastic, které byly formovány za použití Resomeru 653H a Resomeru 753H na ovulaci a kvalitu jiker u jikernaček síha peledě. Během testování byla také zjišťována hormonální odezva na jednotlivá hormonální ošetření.

Material a metody

Experiment s generačními rybami síha peledě proběhl v prosinci roku 2018. Pohlavně zralé jikernačky (200 ks) byly náhodně rozděleny do 4 skupin a umístěny do 4 oddělených nádrží připojených na průtočný systém a bylo jim

VYUŽITÍ PŘÍPRAVKŮ NA BÁZI MIKROČÁSTIC S HORMONÁLNÍ SUBSTANCÍ V AKVAKULTUŘE

ponecháno 7 dní na aklimatizaci. Ryby nebyly v průběhu celého experimentu krmeny a obsah kyslíku ($10,3 \pm 1,0 \text{ mg.l}^{-1}$) a teplota vody ($6,6 \pm 0,8 \text{ °C}$) byly kontrolovány dvakrát denně. Po aklimatizaci byly ryby anestetovány v roztoku hřebíčkového oleje ($0,03 \text{ ml.l}^{-1}$) a jednotlivé skupiny ryb intraperitoneálně injikovány dle následujícího schématu:

Kontrolní skupina (K): fyziologický roztok (Braun, Melsungen AG), jednodávková injekce $0,9\% \text{ NaCl}$,

mGnRHa: injekce přípravku Supergestran (Nordic Pharma, Jesenice, Česká republika) $25 \mu\text{g mGnRHa.kg}^{-1}$ (D-Tle6, Pro9, NEt-mGnRHa, lecirelin),

PLGA 753: PLGA mikročástice formulovány za použití Resomeru RG 753H s enkapsulovaným mGnRHa, 10denní uvolňování GnRHa v celkové dávce $50 \mu\text{g.kg}^{-1}$ mGnRHa ([D-Ala6, des-Gly10]GnRH-ethylamide, alarelin),

PLGA 653: PLGA mikročástice formulované za použití Resomeru RG 653H s enkapsulovaným mGnRHa, 10denní uvolňování mGnRHa v celkové dávce $50 \mu\text{g.kg}^{-1}$ mGnRHa ([D-Ala6, des-Gly10]GnRH-ethylamide, alarelin).



Obr. 10. Odběr krevních vzorků z ocasního násadce síha peledě (Foto: J. Knowles).

U jikernaček byla odebírána krev (Obr. 10.) při zahájení testování a dále 4, 8 a 12 dní po injikaci. Kontrolováno bylo dosažení ovulace, a to v pravidelných intervalech čtyř dnů. V případě uvolnění jiker při jemné masáži břišní dutiny byly jikernačky vytírány přes sítko do samostatných předem označených misek. Získané jikry byly váženy a vzorek neoplozených jiker byl použit k následné kalkulaci absolutní a relativní plodnosti. Sperma od spontánně

spermiujících mlíčáků bylo odebíráno do 3ml stříkaček (Obr. 11) a následně aplikováno na vytřené jikry. Jikry od každé jikernačky byly oplodněny stejným objemem spermatu od třech mlíčáků. Sperma bylo smícháno s jikrami a gamety aktivovány vodou z líhně. Po jemném zamíchání byly jikry umístěny na horizontální třepačku po dobu jedné hodiny. Od každé jikernačky byly odebrány tři vzorky, každý obsahující ~150 oplozených jiker, které byly následně spočítány a inkubovány v malých oddělených inkubátorech (1,7l) vybavených nastavitelným přítokem s přirozenou teplotou vody (Kallert, 2009). V průběhu inkubace bylo v pravidelných intervalech kontrolováno pH ($7,6 \pm 0,1$) a obsah rozpuštěného kyslíku ($10,4 \pm 1,1 \text{ mg.l}^{-1}$). Inkubátory byly pravidelně čištěny a odumřelé jikry byly odstraněny 3ml plastovou pipetou a 50. den inkubace zaznamenán počet jiker v očních bodech.

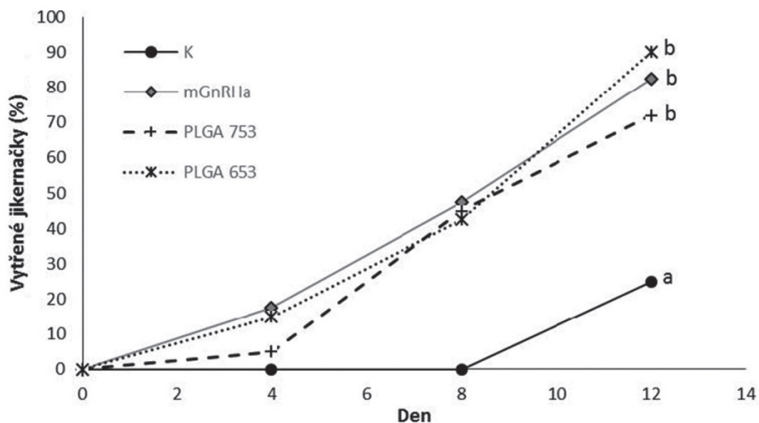


Obr. 11. Odběr spermatu od mlíčáka síha peledě (Foto: J. Knowles).

Výsledky

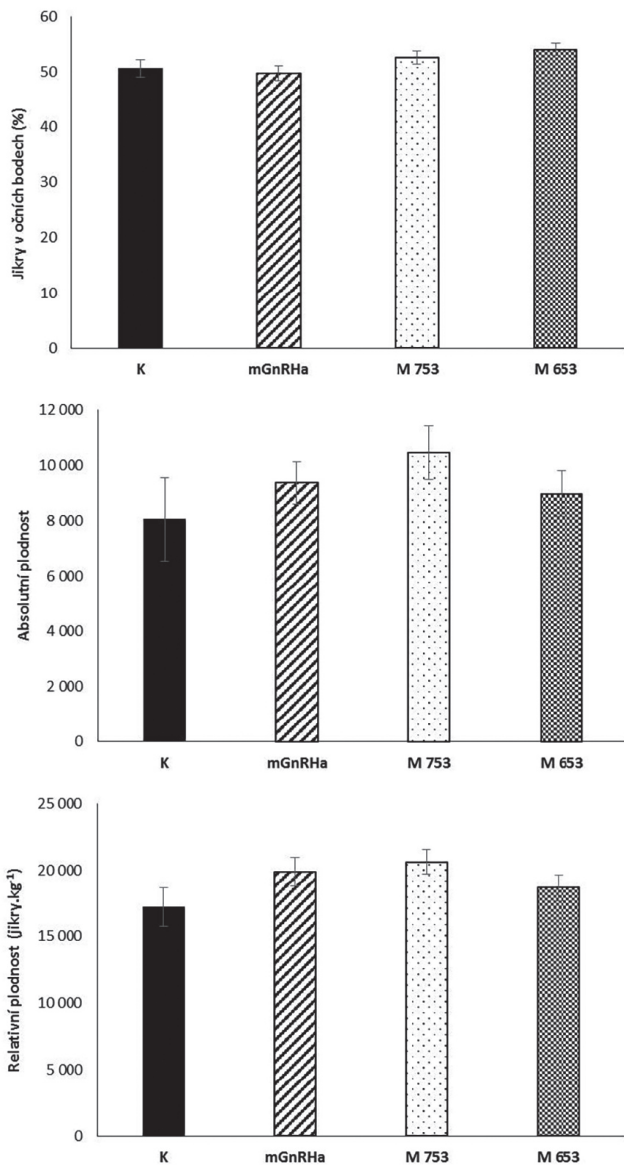
Všechny hormonální stimulační byly asociovány se signifikantně vyšší synchronizací ovulace ve srovnání s kontrolní skupinou, nicméně žádné statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými hormonálními přípravky nebyly nalezeny. První ovulace byla ve všech hormonálně stimulovaných skupinách zaznamenána čtyři dny po ošetření, zatímco první ovulace v kontrolní skupině nastala až po 12 dnech od zahájení experimentu. U ostatních skupin se již v tento den se procento ovulujících jikernaček pohybovalo v rozmezí 70–90 % (Obr. 12).

VYUŽITÍ PŘÍPRAVKŮ NA BÁZI MIKROČÁSTIC S HORMONÁLNÍ SUBSTANCÍ V AKVAKULTUŘE



Obr. 12. Procento vytřených jikernaček síha peledě stimulovaných různými preparáty v průběhu celého testování. Skupiny s rozdílnými indexy značí signifikantní rozdílnost ($P < 0,05$).

Doba latence (časové období od hormonálního ošetření ryb do výtěru) byla signifikantně kratší u všech hormonálně stimulovaných skupin ve srovnání s kontrolou, ale žádné signifikantní rozdíly nebyly mezi těmito skupinami nalezeny. Statisticky průkazné rozdíly ve smyslu absolutní a relativní plodnosti jikernaček nebyly mezi skupinami zaznamenány. Absolutní plodnost se pohybovala průměrně v rozmezí $9\,202 \pm 1\,026$ a průměrná relativní plodnost byla $19\,987 \pm 1\,209$ jiker.kg⁻¹ pro všechny testované skupiny. Mezi jednotlivými skupinami nebyly zjištěny ani žádné staticky průkazné rozdíly v procentu jiker v očních bodech (Obr. 13).

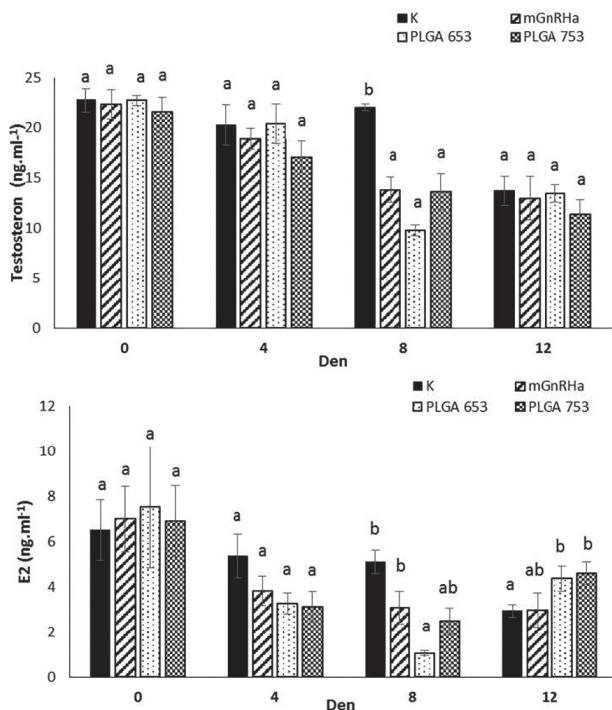


Obr. 13. Absolutní, relativní plodnost a procento jiker v očních bodech u jikernaček síha peledě v průběhu testování (0, 4, 8 a 12 dnů). Výsledky jsou znázorněny jako průměr (sloupec) a směrodatná odchylka (chybová úsečka).

VYUŽITÍ PŘÍPRAVKŮ NA BÁZI MIKROČÁSTIC S HORMONÁLNÍ SUBSTANCÍ V AKVAKULTUŘE

Hladina testosteronu v krevní plazmě jikernaček se snížila směrem k ovulaci. Toto snížení bylo pomalejší u kontrolní skupiny ve srovnání se skupinami s hormonální stimulací. 8. den po zahájení experimentu vykazovaly všechny stimulované skupiny nižší hladinu tohoto hormonu ve srovnání se skupinou kontrolní. Koncentrace testosteronu byla na konci experimentu (12. den) přibližně na shodné úrovni u všech testovaných skupin bez signifikantních rozdílů (Obr. 14).

Koncentrace E2 vykazovala také klesající tendenci směrem k ovulaci s minimálními hodnotami 8. den po injekci u skupin hormonálně stimulovaných a 12. den u skupiny kontrolní. Skupina PLGA 753 vykazovala 8. den po stimulaci signifikantně nižší hladinu E2 ve srovnání s kontrolou a mGnRHa. Na konci experimentu obě skupiny stimulované mikročásticemi vykazovaly zvyšující se úroveň E2 oproti skupině kontrolní (Obr. 14).



Obr. 14. Změny v koncentracích testosteronu a E2 v krevní plazmě jikernaček síha peledě v průběhu testování (0, 4, 8 a 12 dnů). Výsledky jsou znázorněny jako průměr (sloupec) a směrodatná odchylka (chybová úsečka). Signifikantní rozdíly mezi skupinami v době odběru vzorků jsou označeny lišícími se písmennými indexy ($P < 0,05$).

Závěrem lze konstatovat, že pozvolné uvolňování mGnRHa z PLGA mikročastic a jednorázová injekce mGnRHa jsou účinnou hormonální stimulací k indukci a synchronizaci ovulace jikernaček síha peledě. Mezi jednotlivými hormonálními ošetřeními a typem PLGA mikročastic nebyl detekován žádný významný rozdíl a je tedy možné považovat oba typy mikročastic za vhodné k indukci ovulace u tohoto druhu.

4.6.2. Štika obecná (*Esox lucius*)

Štika obecná je jedním ze základních druhů sladkovodních a brakických ekosystémů severní polokoule (Balík a kol., 2006) a v současné době je považovaná za slibného kandidáta pro diverzifikaci intenzivní akvakultury s vysokým ekonomickým potenciálem díky její schopnosti akceptovat granulované krmivo (Kucska a kol., 2005). Přirozený výtěr nastává každoročně na jaře, kdy se teplota vody pohybuje v rozmezí 5–12 °C (Farrell a kol., 1996). Při produkci štiky se víceméně spoléhá na jarní výlov zralých generačních ryb z mělkých rybníků, které jsou následně uměle vytírány bez nebo s pomocí hormonální stimulace (Szabó, 2001). Hlavními nevýhodami tohoto typu reprodukce jsou rozdíly ve fázích zralosti jednotlivých jedinců a vysoká závislost na faktorech prostředí. Tato omezení snižují možnosti produkce larev stejného stáří, které jsou potřebné pro úspěšnost následného odchovu (Bondarenko a kol., 2015a). Další nevýhodou jarního výlovu generačních ryb je vyvolání stresu, který může negativně ovlivnit kvalitu gamet a snížení kvality a kvantity spermatu u mlíčáků (Cejko a kol., 2016).

Při umělé reprodukci se nejčastěji volí mlíčáci o menší kusové hmotnosti do 1 kg (Bondarenko a kol., 2014). Za účelem získání spermatu od mlíčáků se obvykle volí mezi dvěma metodami. V prvním případě se jedná o použití uvolněného spermatu, jež se získává od samců, které je nutné předem hormonálně stimulovat. Pro hormonální stimulaci se v tomto případě nejčastěji používá sušená kapří hypofýza (2 mg.kg⁻¹ živé hmotnosti). Nicméně tato metoda s sebou nese několik zásadních nevýhod, jako je nízký objem spermatu a vysoká kontaminace spermatu močí či krví (Švinger a kol., 2012). V rybářské praxi se proto často volí metoda druhá, kterou je využití tzv. testikulárního spermatu, které je získáváno z usmrcených mlíčáků. Vypreparovaná varlata jsou následně rozstříhána a propasírována přes jemnou tkaninu přímo na ovulované jikry. Nicméně i v tomto případě je doporučováno použití hormonální stimulace, které ve varlatech zvyšuje produkci spermií (Hulak a kol., 2008). Výzkum v oblasti umělé reprodukce štiky obecné je však v současné době zaměřen spíše na její stimulaci za využití GnRHa. Nahrazení dehydratované kapří hypofýzy GnRHa s anebo bez dopaminního inhibitoru nebylo nicméně doposud úspěšné (Szabó, 2001; 2008). Nízká efektivita GnRHa u štiky je připisována jeho nízkým dávkám (do 50 µg.kg⁻¹) a krátkodobému působení (Bondarenko a kol., 2015b).

VYUŽITÍ PŘÍPRAVKŮ NA BÁZI MIKROČÁSTIC S HORMONÁLNÍ SUBSTANCÍ V AKVAKULTUŘE

Účelem tohoto experimentu bylo posoudit účinnost dlouhodobého uvolňování mGnRHa z PLGA mikročastic (s anebo bez jednorázové injekce dopamin inhibitoru) ve srovnání s dehydratovanou kapří hypofýzou na stimulaci spermiace mlíčáků štiky obecné. Dalším cílem testování bylo zjistit vliv těchto hormonálních stimulací na množství a kvalitu spermií, stejně tak jako na hormonální reakci mlíčáků na tato hormonální ošetření.

Materiál a metody

V polovině března 2019 byli mlíčníci štiky obecné (40 ks) vyloveni ze zemních rybníků a transportováni na Experimentální rybochovné pracoviště a pokusnictví FROV JU. Rybám byl ponechán jeden týden na aklimatizaci a poté byli mlíčníci náhodně rozděleni do čtyř skupin ($n = 10$) anestetizovány v roztoku hřebíčkového oleje ($0,05 \text{ ml.l}^{-1}$). Jednotlivé skupiny ryb intraperitoneálně injikovány (Obr. 15) dle následujícího schématu:

Kontrolní skupina (K): fyziologický roztok (Braun, Melsungen AG), jednorázová injekce 0,9% NaCl.

CP: dehydratované kapří hypofýza (FROV JU Vodňany), jednorázová injekce v dávce 2 mg.kg^{-1} .

PLGA: PLGA mikročastice formulovány za použití Resomeru RG 753H s enkapsulovaným mGnRHa, čtyřdenní uvolňování mGnRHa v celkové dávce $20 \mu\text{g.kg}^{-1}$ mGnRHa ([D-Ala6, des-Gly10]GnRH-ethylamide, alarelin).

PLGA + MET: PLGA mikročastice formulovány za použití Resomeru RG 753H s enkapsulovaným mGnRHa plus jednorázová injekce dopamin inhibitoru Metoclopramide (Sigma-Aldrich, USA), Metoclopramide v dávce 20 mg.kg^{-1} a PLGA mikročastice se čtyřdenním uvolňováním mGnRHa v celkové dávce $20 \mu\text{g.kg}^{-1}$ mGnRHa ([D-Ala6, des-Gly10]GnRH-ethylamide, alarelin).



Obr. 15. Intraperitoneální injekce hormonálních přípravků u mlíčáků štiky obecné (Foto: J. Knowles).

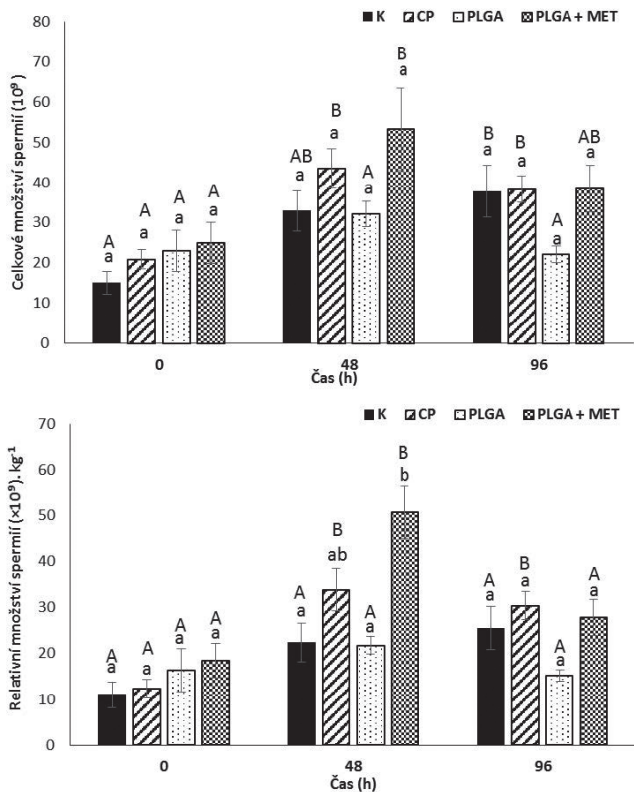
Sperma a krev bylo od mlíčáků odebíráno 0, 48 a 96 hodin po injekci. Před odběry byly ryby anestetizovány a nejprve bylo odebráno sperma tak, aby se předešlo případným ztrátám spermatu. Sperma bylo uvolněno jemnou masáží dutiny břišní. Sperma bylo odebíráno do předem zvážených a označených 3ml injekčních stříkaček (Obr. 16). Každý odebraný vzorek spermatu byl zvážen a hmotnost každého odebraného vzorku spermatu (mg) byla použita jako zástupce pro objem (ml), což umožnilo výpočet celkového počtu spermií na jednoho mlíčáka (koncentrace spermatu x hmotnost spermatu (mg) x 10^9 spermií.ml⁻¹) a relativní hmotnost spermatu (g spermatu.kg⁻¹ tělesné hmotnosti ryby). Sperma bylo uchováno na ledu 0–2 °C a transportováno do laboratoře, kde bylo následně analyzováno. Po odběru spermatu byl každé rybě odebrán vzorek krve do předem heparinizovaných injekčních stříkaček. Odebrané vzorky krve byly okamžitě odstředěny při 5 000 RPM a 10 °C po dobu 10 minut. Odstředěná krevní plazma byla odseparována a uchována při -80 °C pro pozdější laboratorní analýzy.



Obr. 16. Odběr spermatu mlíčáků štiky obecné do injekční stříkačky (Foto: J. Knowles).

Výsledky

Množství celkového získaného spermií bylo signifikantně vyšší 48 hodin po hormonální stimulaci u skupin CP a PLGA ve srovnání s výchozími hodnotami při zahájení experimentu. Po 96 hodinách se celkové množství spermií signifikantně zvýšilo u kontrolní a CP skupiny ve srovnání s hodnotami na počátku experimentu. Mezi jednotlivými skupinami při jednotlivých časových odběrech nebyly nicméně žádné průkazné rozdíly pozorovány. Relativní množství spermatu kopírovalo celkové množství získaného spermatu (Obr. 17). Koncentrace spermií v průběhu experimentu se s pořadím odběru zvyšovala. Množství spermií signifikantně vzrostlo 48 a 96 hodin po hormonální stimulaci u skupin stimulovaných CP a PLGA + MET ve srovnání s výchozími hodnotami. Celkové množství spermií je graficky znázorněno na Obr. 17.

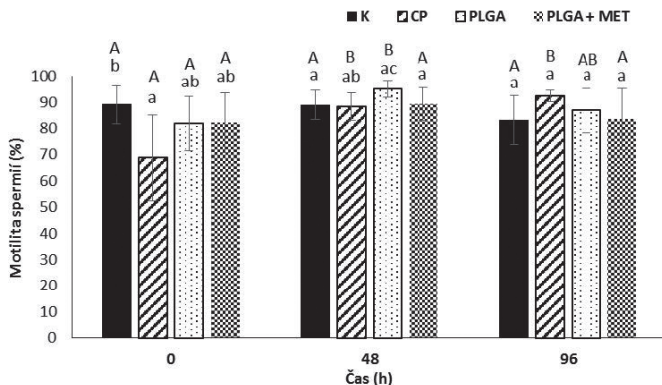


Obr. 17. Celkové a relativní množství spermií u mličáků štiky obecné v průběhu experimentu (0, 48 a 96 h). Statisticky významné rozdíly mezi skupinami v době odběru vzorků jsou označeny malými indexy a statisticky významné rozdíly ve skupině v průběhu experimentálního období jsou označeny velkými indexy ($P < 0,05$). Výsledky jsou znázorněny jako průměr (sloupec) \pm směrodatná odchylka (chybová úsečka).

Průměrná hodnota VAP (10 s po aktivaci) byla na počátku experimentu na hodnotě $110,1 \pm 2,3 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ a 96 hodin po injekci vykazovaly hormonálně stimulované skupiny vyšší hodnoty ve srovnání s kontrolní skupinou. Hodnoty VCL se snížily 48 hodin od injekce u skupiny injikované CP. U kontrolní skupiny bylo zjištěno snížení VCL 96 hodin po zahájení experimentu ve srovnání s ostatními hormonálně stimulovanými skupinami. Zvýšená hodnota VSL byla zaznamenána u skupiny PLGA 96 h po stimulaci ve srovnání s ostatními skupinami. Veškerá data parametrů pohyblivosti spermií jsou přehledně shrnuta v Tab. 1.

VYUŽITÍ PŘÍPRAVKŮ NA BÁZI MIKROČÁSTIC S HORMONÁLNÍ SUBSTANCÍ V AKVAKULTUŘE

Procento pohyblivých spermií bylo prokazatelně nižší na počátku testování u ryb stimulovaných CP se zvyšujícími se hodnotami již 48 hodin po hormonální stimulaci. Obdobné zvýšení motility spermií bylo pozorováno také u mlíčáků stimulovaných PLGA mikročásticemi ve srovnání s počátečními hodnotami. Změny v motilitě spermií jsou graficky zaznamenány na Obr. 18.



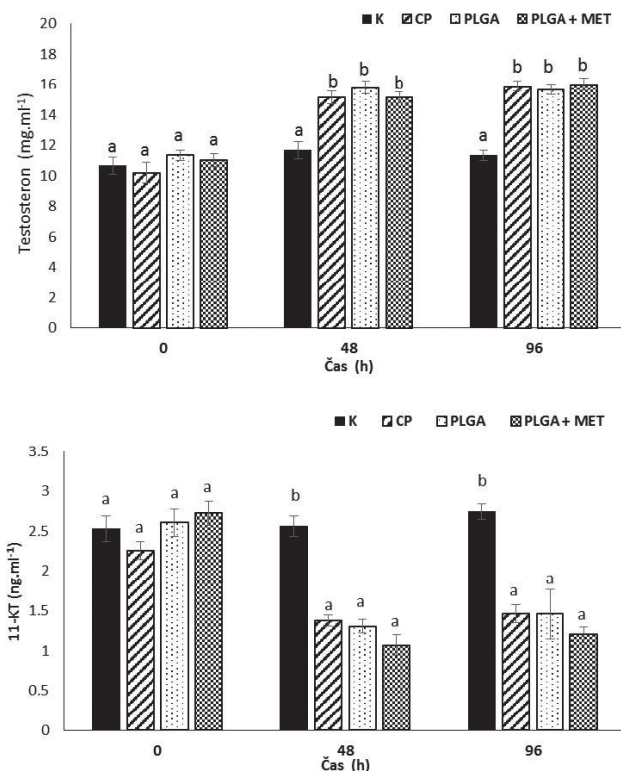
Obr. 18. Motilita spermií u mlíčáků štiky obecné v průběhu pokusu (0, 48 a 96 h). Statisticky významné rozdíly mezi skupinami v době odběru vzorků jsou označeny malými indexy a statisticky významné rozdíly ve skupině během experimentálního období jsou značeny velkými indexy ($P < 0,05$). Výsledky jsou zaznamenány jako průměr (sloupec) \pm směrodatná odchylka (chybová úsečka).

Tab. 1. Hodnoty průměrné rychlosti spermií (VAP), křivočaré rychlosti (VCL), přímé rychlosti (VSL) 10 s po aktivaci u mlíčáků štiky obecné v průběhu experimentu (0, 48 a 96 h). Signifikantní rozdíly mezi skupinami v době odběru vzorků jsou značeny malými indexy $P < 0,05$).

Skupina	VAP			VCL			VSL		
	0	48	96	0	48	96	0	48	96
K	116,7 ± 1,7 ^a	123,7 ± 1,6 ^b	106,8 ± 4,6 ^a	128,1 ± 1,5 ^a	131,5 ± 1,6 ^b	115,5 ± 4,6 ^a	90,8 ± 1,7 ^a	100,7 ± 1,1 ^b	88,6 ± 3,8 ^a
CP	106,6 ± 4,7 ^a	115,1 ± 2,6 ^a	122,8 ± 1,2 ^b	117,6 ± 3,8 ^a	120,0 ± 2,7 ^a	123,3 ± 1,6 ^b	84,4 ± 3,9 ^a	93,1 ± 2,6 ^a	95,6 ± 1,1 ^a
PLGA	105,7 ± 3,6 ^a	118,1 ± 1,7 ^{ab}	122,7 ± 1,2 ^b	114,9 ± 3,6 ^a	127,6 ± 1,6 ^b	128,4 ± 1,4 ^b	85,2 ± 3,3 ^a	93,9 ± 1,6 ^{ab}	100,6 ± 1,2 ^b
PLGA + MET	111,6 ± 6,3 ^a	127,2 ± 1,2 ^b	121,1 ± 2,1 ^b	122,8 ± 4,7 ^a	133,7 ± 1,2 ^b	127 ± 2 ^b	88,1 ± 5,8 ^a	100,6 ± 1,2 ^b	96,2 ± 2,2 ^a

VYUŽITÍ PŘÍPRAVKŮ NA BÁZI MIKROČÁSTIC S HORMONÁLNÍ SUBSTANCÍ V AKVAKULTUŘE

Analýza steroidů z krevní plazmy neprokázala žádné rozdíly mezi skupinami v koncentraci E2 v průběhu experimentu. Hladina E2 vykazovala poměrně stabilní hodnoty v průběhu celého experimentu s průměrnou hodnotou $347,4 \pm 24,3 \text{ mg.ml}^{-1}$. Změny byly zaznamenány v koncentraci 11-KT, kdy skupiny injikované hormonálními preparáty vykazovaly nižší hodnoty tohoto steroidu jak ve srovnání s výchozími koncentracemi, tak i kontrolní skupinou. Naproti tomu hladina testosteronu vykazovala opačný trend než hladina 11-KT. Koncentrace testosteronu se zvýšila u všech hormonálně stimulovaných skupin ve srovnání s kontrolní skupinou. Grafické znázornění změn v plazmatické koncentraci testosteronu a 11-KT je uvedeno na Obr. 19.



Obr. 19. Změny v plazmatické koncentraci testosteronu a 11-KT u mlíčáků štiky obecné v průběhu pokusu (0, 48 a 96 h). Signifikantní rozdíly mezi skupinami jsou označeny malými indexy ($P < 0,05$). Data jsou prezentována jako průměr (sloupec) \pm směrodatná odchylka (chybová úsečka).

Na závěr lze konstatovat, pozvolné uvolňování mGnRHa z mikročastic mělo pozitivní vliv na relativní množství získaného spermatu. V ostatních sledovaných parametrech, jako je motilita spermií, rychlost pohybu spermií či hladiny pohlavních steroidů, byla účinnost PLGA mikročastic srovnatelná s akutní injekcí dehydratované kapří hypofýzy.

4.6.3. Candát obecný (*Sander lucioperca*)

Candát obecný je vysoce ceněný druh s obrovským potenciálem v evropské sladkovodní akvakultuře (Wang a kol., 2009). Jedním z největších problémů při chovu tohoto druhu je jeho umělá reprodukce (Philipsen a Van der Kraak, 2008). V současné době je nejvíce využíván přirozený výtěr (Steffens a kol., 1996) nebo podpora přirozeného výtěru za použití umělých hnízd, která jsou umístěna přímo do chovné nádrže (Malinovsky a kol., 2018). Kromě výhod, jako je nízká potřeba práce a manipulace s rybami, však tyto metody mají významné nevýhody. Mezi ně například patří nízká oplozenost, časté výtěry mimo hnízdo (Žarski a kol., 2015) či nemožnost provedení triploidizace (Dadras a kol., 2021).

Užití hormonální stimulace je nutné před samotným umělým výtěrem. K hormonální stimulaci je u candáta nejčastěji využíváno hCG a GnRHa (Žarski a kol., 2015). Nicméně hCG může mít negativní efekt na kvalitu gamet (Žarski a kol., 2012) a může zvýšit produkci kortizolu, který následně ještě více negativně ovlivňuje kvalitu pohlavních produktů (Žarski a kol., 2019). Kromě hormonální substance může ovšem i forma jeho aplikace výrazně ovlivnit účinnost stimulace (Schreck a kol., 2001). Toto stanovisko bylo autory této publikace ověřeno u jikernaček candáta obecného, které vykazovaly mnohonásobně vyšší ovulaci po aplikaci PLGA mikročastic s navázaným mGnRHa ($5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) ve srovnání se skupinou injikovanou pouze samotným mGnRHa ($20 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$). Procento vytřených jikernaček ve skupině injikované PLGA mikročasticemi bylo 100 % ve srovnání se 40 % vytřených jikernaček, které byly hormonálně ošetřeny mGnRHa a žádnou vytřenou jikernačkou z kontrolní skupiny. V ostatních parametrech, jako je množství získaných jiker, doba latence či líhivost, nebyly mezi jednotlivými ošetřeními nalezeny žádné signifikantní rozdíly (Knowles a Podhorec, 2020). K doplnění a rozšíření technologie využití PLGA mikročastic u ryb byli zvoleni i samci, jelikož hodnocení spermií může pomoci určit efekt hormonálního ošetření na jejich množství a kvalitu. Kromě toho může poskytnout informace týkající se optimálního času spermií pro jejich odběr a také jejich schopnost oplodnit vajíčko (Teletchea a kol., 2009).

Cílem tohoto testování bylo porovnat vliv dlouhodobého uvolňování mGnRHa enkapsulovaného v PLGA mikročasticích s jednodávkou aplikací mGnRHa a kontrolní skupinou. Dalším cílem bylo určit vliv jednotlivých hormonálních ošetření na spermiaci, kvantitu a kvalitu spermií a hormonální odezvu u mlíčáků candáta obecného.

VYUŽITÍ PŘÍPRAVKŮ NA BÁZI MIKROČÁSTIC S HORMONÁLNÍ SUBSTANCÍ V AKVAKULTUŘE

Materiál a metody

V březnu roku 2019 byli mlíčáci candáta obecného (40 ks) vyloveni ze zemních rybníků a umístěni do sádky, kde jim byl ponechán týden na aklimatizaci. Na konci aklimatizačního období trvajícího 10 dnů a kdy voda dosáhla teploty 15 °C, byli mlíčáci vyloveni a náhodně rozděleni do 4 skupin. Před aplikací jednotlivých preparátů byly ryby anestetizovány v roztoku hřebíčkového oleje (0,04 ml.l⁻¹), byl jim odebrán vzorek krve a jednotlivé skupiny ryb intraperitoneálně injikovány (Obr. 20) dle následujícího schématu:

Kontrolní skupina (K): fyziologický roztok (Braun, Melsungen AG), jednorázová aplikace 0,9% NaCl v dávce 1 ml.kg⁻¹.

mGnRHa: stimulace přípravkem Supergestran (Nordic Pharma, Jesenice, Česká republika) v dávce 12,5 µg mGnRHa.kg⁻¹ (D-Tle6, Pro9, NEt-mGnRHa, lecirelin).

PLGA 1: PLGA mikročástice formulovány za použití Resomeru RG 753H s enkapsulovaným mGnRHa, pětidenní uvolňování mGnRHa v celkové dávce 1 µg.kg⁻¹ mGnRHa ([D-Ala6, des-Gly10]GnRH-ethylamide, alarelin).

PLGA 10: PLGA mikročástice formulovány za použití Resomeru RG 753H s enkapsulovaným mGnRHa, pětidenní uvolňování mGnRHa v celkové dávce 10 µg.kg⁻¹ mGnRHa ([D-Ala6, des-Gly10]GnRH-ethylamide, alarelin).



Obr. 20. Intraperitoneální injekce mlíčáka candáta obecného (Foto: J. Knowles).

Sperma bylo od mlíčáků odebíráno 48 a 72 hodin po injekci (Obr. 21). Sperma bylo odebíráno do předem zvážených a označených 5ml injekčních stříkaček. Po odběru bylo sperma uchováno na ledu 0–2 °C a transportováno do laboratoře. Vzorkování krve probíhalo vždy v pravidelných intervalech 24 hodin (0, 24, 48, 72 hodin po injekci). Vzorky krve byly okamžitě odstředěny (5 000 RPM, 10 °C, 10 min) a získaná krevní plazma byla odseparována a uchována při -80 °C pro pozdější laboratorní analýzy. Analýzy pohlavních steroidů probíhaly dle metodiky uvedené v kapitole 4.3.

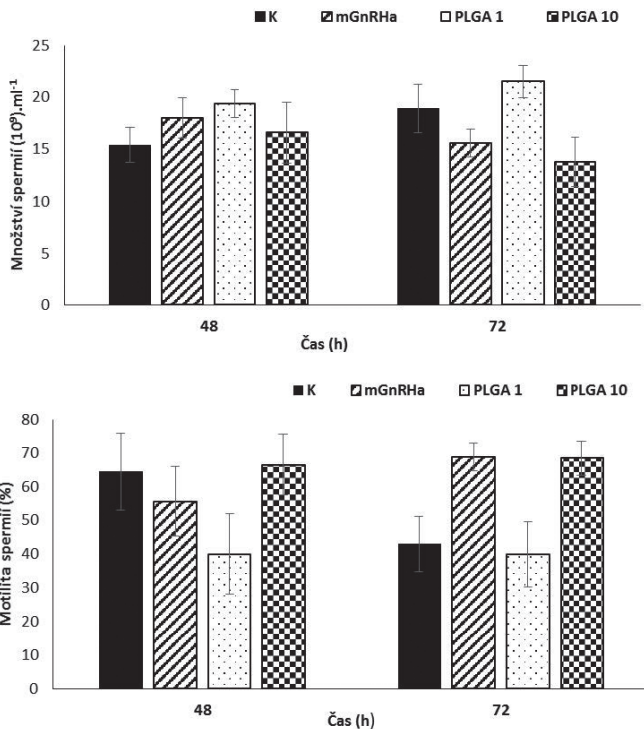


Obr. 21. Odběr spermatu u mlíčáka *candata* obecného (Foto: J. Knowles).

Výsledky

Žádné statisticky průkazné rozdíly nebyly detekovány v množství spermií, tak i v jejich motilitě. Grafické znázornění koncentrace a motility spermií u mlíčáků *candata* obecného je znázorněno na Obr. 22.

VYUŽITÍ PŘÍPRAVKŮ NA BÁZI MIKROČÁSTIC S HORMONÁLNÍ SUBSTANCÍ V AKVAKULTUŘE



Obr. 22. Změny v množství spermíí a procento pohyblivých spermíí u mlíčáků candáta obecné v průběhu experimentu (48 a 72 h). Výsledky jsou prezentovány jako průměr (sloupec) a směrodatná odchylka (chybová úsečka).

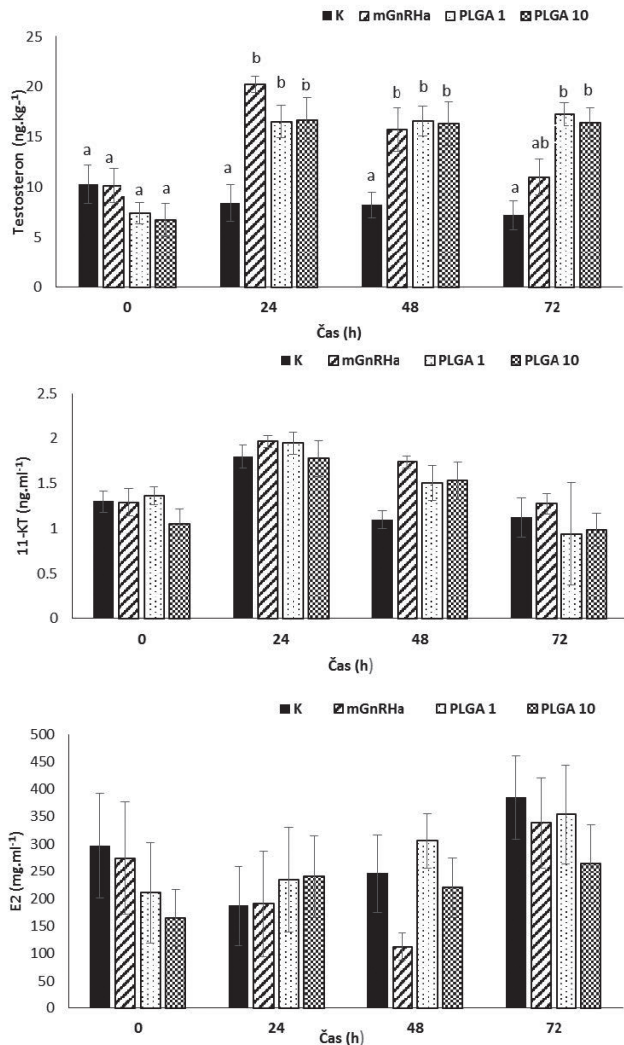
Žádný ze zkoumaných parametrů pohyblivosti spermíí (VAP, VCL, VSL) se nelišil mezi jednotlivými skupinami v průběhu celého testování. Podrobná data VAP, VCL, VSL získaná 10 s po aktivaci spermíí jsou zaznamenána v Tab. 2.

Tab. 2. Pohybové charakteristiky spermíí u mlíčáků candáta obecného získaná 10 s po aktivaci. Data jsou prezentována jako průměr ± směrodatná odchylka.

Skupina	VAP		VCL		VSL	
	48	96	48	96	48	96
K	106,9 ± 3,7	93,5 ± 5,1	82,5 ± 1,2	76,2 ± 4,6	23,5 ± 1,9	27,2 ± 1,1
mGnRHα	96,8 ± 5,5	103,2 ± 4,5	82,0 ± 2,1	83,6 ± 2,5	30,0 ± 1,6	30,9 ± 1,6
PLGA 1	90,2 ± 3,4	97,6 ± 5,5	77,2 ± 3,4	79,6 ± 4,0	29,4 ± 1,3	33,9 ± 2,1
PLGA 10	106,5 ± 4,4	103,4 ± 4,5	83,4 ± 2,8	81,1 ± 1,4	26,0 ± 1,7	31,4 ± 2,7

Analýzy pohlavních steroidů ukázaly zvýšení hladiny testosteronu u všech hormonálně stimulovaných skupin již po 24 hodinách od zahájení experimentu. Obě skupiny injikované PLGA vykazovaly stabilně zvýšené hodnoty PLGA po celou dobu experimentu, zatímco skupina injikovaná mGnRHa vykazovala snižující se trend po 72 hodinách od injekce. Hladiny 11-KT se mírně zvýšily 24 hodin po injekci a poté následně pozvolna klesaly s postupující spermiací, nicméně žádné signifikantní rozdíly mezi skupinami nebyly potvrzeny. Velmi nestabilní koncentrace v krevní plazmě byly zaznamenány u E2. Nestabilní hladiny tohoto hormonu byly zaznamenány jak mezi skupinami, tak i uvnitř skupin samotných. Vzhledem k tomu, že E2 může být konvertován přímo z testosteronu lze předpokládat, že tyto nestabilní hladiny E2 mohou být způsobené jeho nedostatečnou konverzí z tohoto hormonu. Graficky zaznamenané změny v koncentracích pohlavních steroidů jsou zaznamenány na Obr. 23.

VYUŽITÍ PŘÍPRAVKŮ NA BÁZI MIKROČÁSTIC S HORMONÁLNÍ SUBSTANCÍ V AKVAKULTUŘE



Obr. 23. Hladiny pohlavních steroidů (Testosteronu, 11-KT, E₂) v krevní plazmě mlíčáka candáta obecného zaznamenané v průběhu pokusu (0, 24, 48 a 72 h). Výsledky jsou zaznamenány jako průměr (sloupec) a směrodatná odchylka (chybová úsečka). Signifikantní rozdíly koncentrace testosteronu mezi skupinami jsou označeny malými písmeny ($P < 0,05$). V hladinách 11-KT a E₂ nebyly zaznamenaný žádné statisticky průkazné rozdíly a tato indikace tedy chybí.

Z výše uvedených výsledků vyplývá, že mezi jednotlivými hormonálními stimulacemi nebyly nalezeny žádné statisticky průkazné rozdíly a jednotlivé hormonální ošetření jsou v účinku na spermie, kvalitu a kvantitu spermií srovnatelné.

4.6.4. Okoun říční (*Perca fluviatilis*)

Okoun říční je novým a velmi ceněným druhem v intenzivní akvakultuře, který může významně přispět k její diverzifikaci, především v Evropě (Fontaine a Teletchea, 2019). Okoun říční se rozmnožuje v období od dubna do května, kdy teplota vody přesáhne 10 °C (Gillet a Dubois, 2007). Generační ryby jsou ve výtěrovém období nejčastěji získávány výlovem z rybníků, nicméně reprodukční období může u okouna trvat déle než dva týdny, což výrazně komplikuje následný odchov larev a organizaci na líhni (Kucharczyk a kol., 1996b). Z těchto důvodů může být vhodné použití hormonální stimulaci a synchronizace výtěrů okouna říčního. Za tímto účelem bylo u okouna použito mnoho druhů hormonální stimulace, jako je např. hCG, CPE, GnRHa, GTH a dopaminních inhibitorů (Dabrowski a kol., 1994; Kucharczyk a kol., 1996a; Kouril a Linhart, 1997). Nezávisle na teplotě, velikosti generační ryby, zralosti pohlavních žláz či hormonální stimulace byla ve výše uvedených experimentech synchronizace výtěrů pozorována v menší či větší míře. Nicméně kvalita jiker se výrazně lišila jak mezi experimenty, tak v rámci jedné testované skupiny (Kouřil a kol., 2020). Dle našich informací nebyl u okouna doposud použit žádný systém pro dlouhodobé uvolňování léčiv, který má u mnoha druhů ryb pozitivní účinky na kvalitu právě pohlavních produktů.

Cílem tohoto technologického postupu bylo ověřit a porovnat účinnost několika různých dávek mGnRHa enkapsulovaného v PLGA mikročasticích na ovulaci a ostatní reprodukční parametry jikernaček okouna říčního. Dílčím cílem této práce bylo zjistit hormonální změny v hladině pohlavních steroidů analýzou krevní plazmy.

Materiál a metody

Jikernačky okouna říčního (75 ks) byly vyloveny na počátku dubna ze zemních rybníků a transportovány na Experimentální rybochovné pracoviště a pokusnictví FROV JU. Zde byl rybám poskytnut týden na aklimatizaci a poté byly jikernačky náhodně rozděleny do pěti skupin, každá čítající 15 jikernaček. Každá ze skupin byla umístěna do oddělené nádrže připojená na recirkulační systém s teplotou vody $13,5 \pm 0,2$ °C. a obsahem rozpuštěného kyslíku $9,58 \pm 0,82$ mg.l⁻¹. Po uplynutí aklimatizačního období byly jednotlivé skupiny intraperitoneálně injikovány následujícími preparáty v dávce 1 ml.kg⁻¹:

VYUŽITÍ PŘÍPRAVKŮ NA BÁZI MIKROČÁSTIC S HORMONÁLNÍ SUBSTANCÍ V AKVAKULTUŘE

Kontrolní skupina (K): fyziologický roztok (Braun, Melsungen AG), jednorázová injekce 0,9% NaCl.

mGnRHa: injekce přípravku Supergestran (Nordic Pharma, Jesenice, Česká republika) v dávce 12,5 $\mu\text{g mGnRHa.kg}^{-1}$ (D-Tle6, Pro9, NET-mGnRHa, lecirelin).

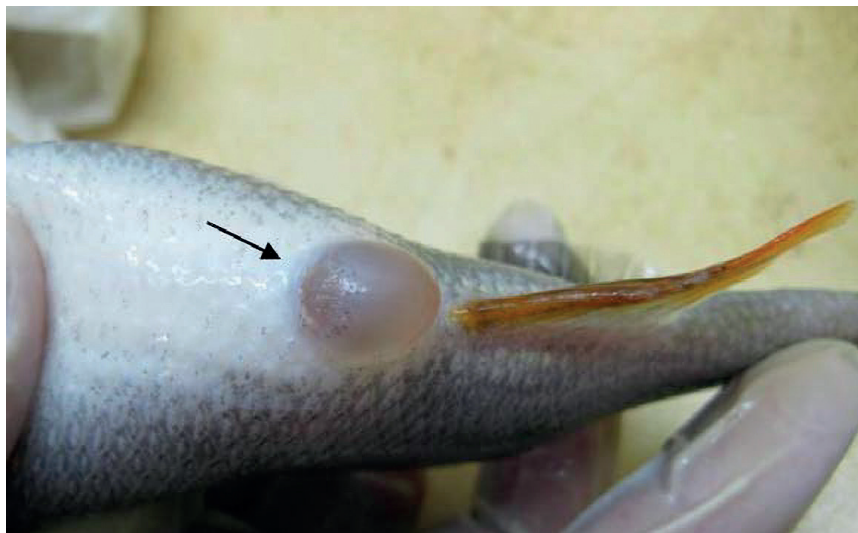
PLGA 10: PLGA mikročástice formulovány za použití Resomeru RG 653H s enkapsulovaným mGnRHa, pětidenní uvolňování mGnRHa v celkové dávce 10 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ mGnRHa ([D-Ala6, des-Gly10]GnRH-ethylamide, alarelin).

PLGA 20: PLGA mikročástice formulovány za použití Resomeru RG 653H s enkapsulovaným mGnRHa, pětidenní uvolňování mGnRHa v celkové dávce 20 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ mGnRHa ([D-Ala6, des-Gly10]GnRH-ethylamide, alarelin).

PLGA 30: PLGA mikročástice formulovány za použití Resomeru RG 653H s enkapsulovaným mGnRHa, pětidenní uvolňování mGnRHa v celkové dávce 30 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ mGnRHa ([D-Ala6, des-Gly10]GnRH-ethylamide, alarelin).

Odběr krve byl proveden při zahájení testování (0) a dále 14, 28 hodin po injekci a v době ovulace jikernačky. V případě, že jikernačka nedosáhla ovulace, byl poslední krevní vzorek odebrán po 1 týdnu od injekce. Stav ovulace začal být u jikernaček kontrolován 24 hodin po aplikaci preparátů a poté byly jikernačky kontrolovány každé 4 hodiny. V případě ovulace byla jikernačka odlovena z nádrže, zabalena do vlhké tkaniny a vytírána klasickou suchou metodou (Obr. 24) do předem zvážených a označených misek. Po vytření jikernaček byly jikry zváženy (Kern PCB 800) a následně odebrán vzorek jiker, který byl použit pro výpočet plodnosti jikernačky.

Vytřené jikry byly oplozeny spermatem, které bylo odebíráno od mlíčáků, kteří přirozeně uvolňovali sperma. Sperma bylo odebíráno do 5ml injekčních stříkaček a k osemnění jiker jedné jikernačky bylo použito sperma alespoň od tří mlíčáků (2ml spermatu na 100 g jiker). Po přidání spermatu k jikrám byla směs promíchána a gamety aktivovány čistou vodou z líhně. Po jemném promíchání (4 min) byla směs propláchnuta čistou vodou a vzorky jiker (cca 100 kusů) byly inkubovány v malých plastových inkubátorech umístěných ve žlabech připojených na recirkulační systém s teplotou vody $15,2 \pm 0,2$ °C. Po 6 dnech od počátku inkubace bylo makroskopicky počítáno množství jiker v očních bodech, které bylo použito k hodnocení kvality jiker.

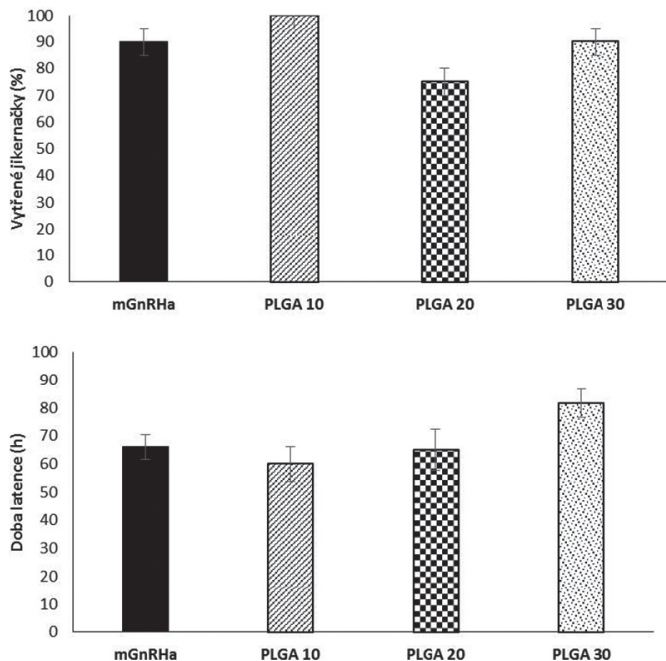


Obr. 24. Detailní pohled na močopohlavní papilu před umělým výtěrem a umělý výtěr jikernačky okouna říčního (Foto: J. Knowles).

Výsledky

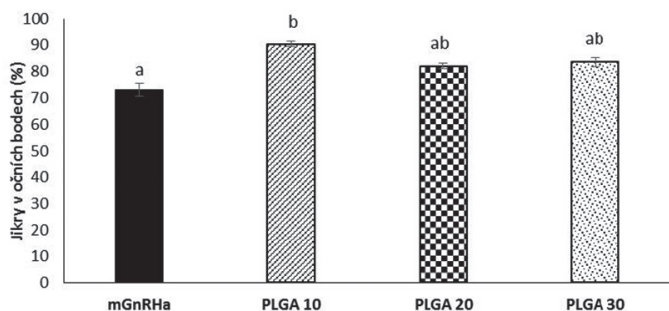
U všech skupin injikovaných hormonálními přípravky byl umělý výtěr úspěšný. Procento vytřených jikernaček se u všech hormonálně stimulovaných skupin pohybovalo v rozmezí 75–100% a mezi individuálními skupinami nebyl zaznamenán žádný signifikantní rozdíl. Z kontrolní skupiny neovulovala žádná z jikernaček. Žádný rozdíl nebyl nalezen ani v době latence, která byla $68,1 \pm 5,7$ hodin pro všechny hormonálně injikované skupiny, přičemž první ovulace byla zaznamenána 41 hodin po stimulaci. Procento ovulujících jikernaček a doba latence je graficky zaznamenáno na Obr. 25.

VYUŽITÍ PŘÍPRAVKŮ NA BÁZI MIKROČÁSTIC S HORMONÁLNÍ SUBSTANCÍ V AKVAKULTUŘE



Obr. 25. Procento vytřených jikernaček a doba latence u okouna říčního u jednotlivých testovaných skupin. Data jsou prezentována jako průměr (sloupec) a směrodatná odchylka (chybová úsečka).

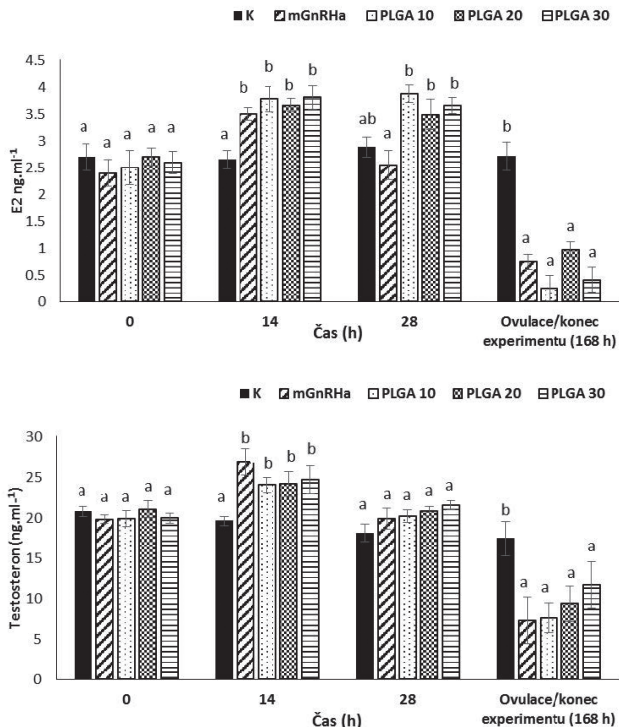
Vliv hormonální stimulace na množství získaných jiker nebyl prokázán. Absolutní plodnost se pohybovala průměrně v rozmezí $32\,143 \pm 15\,945$ pro všechny hormonálně stimulované jikernačky. Průměrná relativní plodnost byla $155\,286 \pm 35\,214$ jiker.kg⁻¹. Pozitivní vliv hormonálního ošetření na kvalitu jiker byl prokázán u skupiny PLGA 10 ve srovnání s mGnRHα skupinou (Obr. 26). Procento jiker v očích bodech se u této skupiny pohybovalo na úrovni $90,3 \pm 1,9\%$, zatímco u skupiny mGnRHα byla tato hodnota pouze $73,8 \pm 3,0\%$.



Obr. 26. Procento jiker v očních bodech u jednotlivých skupin okouna říčního. Data jsou prezentována jako průměr (sloupec) a směrodatná odchylka (chybová úsečka). Signifikantní rozdíly mezi skupinami označeny malými indexy ($P < 0,05$).

Vysoké koncentrace E2 a testosteronu byly měřeny 14 hodin po zahájení testování u skupin, které byly hormonálně stimulované. Následně koncentrace obou těchto hormonů klesaly směrem k ovulaci, vyjma kontrolní skupiny, která měla hladinu těchto hormonů po celou dobu experimentu na stejné úrovni (Obr. 27). Vysoké koncentrace E2 a testosteronu na počátku experimentu naznačují jejich důležitou roli v konečném zrání ovocytů. V předchozích studiích bylo prokázáno, že častá manipulace a stres může u ryb způsobit snížené hladiny E2 a testosteronu (Schreck a kol., 2001). Lze tedy předpokládat, že při umělém výtěru na rybářských podnicích (bez odběrů krve, nutných k zachycení průběhu ovulace) mohou být koncentrace těchto hormonů ještě vyšší.

VYUŽITÍ PŘÍPRAVKŮ NA BÁZI MIKROČÁSTIC S HORMONÁLNÍ SUBSTANCÍ V AKVAKULTUŘE



Obr. 27. Změny v hladině E2 a testosteronu v krevní plazmě jikernaček okouna říčního odebraných v různých časových intervalech (0, 14, 28 a při ovulaci či ukončení experimentu). Data jsou prezentována jako průměr (sloupec) a směrodatná odchylka (chybová úsečka). Signifikantní rozdíly mezi skupinami v době odběru vzorků jsou označeny malými indexy ($P < 0,05$).

V průběhu testování byl prokázán pozitivní vliv dlouhodobého uvolňování mGnRHa 10 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ mGnRHa na množství jiker v očních bodech. V ostatních reprodukčních parametrech nebyl nalezen žádný průkazný rozdíl. Závěrem lze říci, že mezi jednotlivými hormonálními stimulacemi, stejně tak jako mezi jednotlivými dávkami mGnRHa nebyl nalezen žádný statisticky průkazný rozdíl a účinky jednotlivých hormonálních ošetření jsou srovnatelné.

5. EKONOMICKÝ PŘÍNOS

Technologie použití PLGA mikročastic umožňuje využití dlouhodobého uvolňování mGnRHa z PLGA mikročastic jako alternativního způsobu indukce ovulace a spermiace u mnoha hospodářsky významných druhů ryb. Výsledky testování prokázaly, že účinek tohoto ošetření je srovnatelný s jinými hormonálními preparáty, jako je aplikace čistého mGnRHa nebo dehydratované hypofýzy. Nicméně je nutné podotknout, že díky využití PLGA mikročastic jako nosiče hormonálních substancí dochází k eliminaci použití opakovaných injekcí, a tím i zlepšení welfare ryb. Při aplikaci PLGA mikročastic lze navíc přistoupit ke snížení celkové účinné dávky mGnRHa, jejíž pořízení je zpravidla velmi ekonomicky nákladné. Další nespornou výhodou je také to, že PLGA je schválena Americkým úřadem pro kontrolu potravin a léčiv a Evropskou lékovou agenturou.

Přesný odhad ekonomického zhodnocení pro rybářské podniky je velmi komplikovaný kvůli vysoké rozmanitosti jak jednotlivých podniků, tak i druhům ryb, u kterých je možné výše uvedenou technologii aplikovat. Předpokládané ekonomické přínosy jsou tvořené zejména sníženými dávkami účinného mGnRHa a mohou se pohybovat v řádech milionů českých korun.

6. UPLATNĚNÍ TECHNOLOGIE V PRAXI

Popsaná a v provozních podmínkách ověřená technologie může být uplatněna na všech rybářských podnicích, líhních, vědecko-výzkumných pracovištích nejen v České republice, ale pravděpodobně i zahraničí. Jedná se o technologii, která může pro rybářskou praxi znamenat relativně jednoduchý způsob stimulace, synchronizace a zlepšení efektivity umělé reprodukce mnoha významných druhů ryb.

7. SEZNAM LITERATURY

- Agulleiro, M.J., Anguis, V., Cañavate, J.P., Martínez-Rodríguez, G., Mylonas, C.C., Cerdà, J., 2006. Induction of spawning of captive-reared Senegal sole (*Solea senegalensis*) using different administration methods for gonadotropin-releasing hormone agonist. *Aquaculture* 257: 511-524.
- Aizen, J., Meiri, I., Tzchori, I., Levavi-Sivan, B., Rosenfeld, H., 2005. Enhancing spawning in the grey mullet (*Mugil cephalus*) by removal of dopaminergic inhibition. *General and Comparative Endocrinology* 142: 212-221.
- Arabacı, M., Çağırğan, H., Sarı, M., 2004. Induction of ovulation in ornamental common carp (Koi, *Cyprinus carpio* L.) using LHRHa ([d-Ser (tBu) 6, Pro9-NET]-LHRH) combined with haloperidol and carp pituitary extract. *Aquaculture Research* 35: 10-14.

VYUŽITÍ PŘÍPRAVKŮ NA BÁZI MIKROČÁSTIC S HORMONÁLNÍ SUBSTANCÍ V AKVAKULTUŘE

- Bale, S., Khurana, A., Reddy, A.S.S., Singh, M., Godugu, C., 2016. Overview on therapeutic applications of microparticulate drug delivery systems. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems* 33: 309–631.
- Balik, I., Çubuk, H., Özkök, R., Uysal, R., 2006. Reproduction properties of pike (*Esox lucius* L., 1758) population in Lake Karamık (Afyonkarahisar/Turkey). *Turkish Journal of Zoology* 30: 27–34.
- Bondarenko, V., Křišťan, J., Švinger, V.W., Policar T., 2014. Reprodukce a odchov rychleného plůdku štiky obecné (*Esox lucius*). *Edice Metodik, FROV JU, Vodňany*, č. 144. 53 s.
- Bondarenko, V., Drozd, B., Policar, T., 2015a. Effect of water temperature on egg incubation time and quality of newly hatched larvae of northern pike (*Esox lucius* L., 1758). *Journal of Applied Ichthyology* 31: 45–50.
- Bondarenko, V., Podhorec, P., Švinger, V., Policar, T., 2015b. Evaluation of treatments for induction of ovulation in northern pike (*Esox lucius* L.). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 15: 575–581.
- Brown, L., Munoz, C., Siemer, L., Edelman, E., Langer, R., 1986. Controlled release of insulin from polymer matrices: control of diabetes in rats. *Diabetes* 35: 692–697.
- Cabrera E, Robles V, Herráez P, 2008. *Methods in reproductive aquaculture: marine and freshwater species*. CRC press, Boca Raton, USA, 549 pp.
- Cejko, B., Sarosiek, B., Krejszeff, S., Judycka, S., Szczepkowski, M., Szczepkowska, B., Kowalski, R., 2016. Effects of different stripping methods of female and activation medium on fertilization success in northern pike (*Esox lucius*). *Czech Journal of Animal Science* 61: 481–486.
- Cejko, B.I., Krejszeff, S., Zarski, D., Judycka, S., Targońska, K., Kucharczyk, D., 2018. Effect of carp pituitary homogenate (CPH) and sGnRHa (Ovaprim) on northern pike (*Esox lucius*) spermiation stimulation and its effect on quantity and quality of sperm. *Animal Reproduction Science* 193: 217–225.
- Dabrowski, K., Ciereszko, A., Ramseyer, L., Culver, D., Kestemont, P., 1994. Effects of hormonal treatment on induced spermiation and ovulation in the yellow perch (*Perca flavescens*). *Aquaculture* 120: 171–180.
- Dadras, H., Blecha, M., Malinovskyi, O., Flajšhans, M., Lebeda, I., Křišťan, J., Policar, T., 2021. Triploidization in pikeperch (*Sander lucioperca*) induced by cold shock. *Aquaculture* 533: 736236.
- Fakriadis, I., Lisi, F., Sigelaki, I., Papadaki, M., Raftopoulos, A., Mylonas, C.C., 2017. Spawning kinetics of greater amberjack *Seriola dumerili* in response to multiple GnRHa injections or implants. *Aquaculture Europe* 16–20.
- 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 GnRHa injections or implants. *General and Comparative Endocrinology* 279: 78–87.
- Farrell, J.M., Werner, R., LaPan, S., Claypoole, K., 1996. Egg distribution and spawning habitat of northern pike and muskellunge in a St. Lawrence River marsh, New York. *Transactions of the American Fisheries Society* 125: 127–131.
- Fitzpatrick, M.S., 2012. Effects of stress on fish reproduction, gamete quality, and progeny. *Reproductive Biotechnology in Finfish Aquaculture* 3: 3–24.
- Fontaine, P., Teletchea, F., 2019. Domestication of the Eurasian perch (*Perca fluviatilis*). In: *Animal domestication*. IntechOpen, London, UK, pp. 137–159.
- Gillet, C., Dubois, J.P., 2007. Effect of water temperature and size of females on the timing of spawning of perch *Perca fluviatilis* L. in Lake Geneva from 1984 to 2003. *Journal of Fish Biology* 70: 1001–1014.

- Gordeeva, N., Karmanova, O., Shitova, M., 2008. Genetic and morphoecological characteristics of peled *Coregonus peled* acclimatized in lakes of Tuva Republic. Journal of Ichthyology 48: 573–582.
- Goren, A., Zohar, Y., Fridkin, M., Elhanati, E., Koch, Y., 1990. Degradation of gonadotropin-releasing hormones in the gilthead seabream, *Sparus aurata*: I. Cleavage of native salmon GnRH and mammalian LHRH in the pituitary. General and Comparative Endocrinology. 79: 291–305.
- Gothlif, Y., Zohar, Y., 1991. Clearance of different forms of GnRH from the circulation of the gilthead seabream, *Sparus aurata*, in relation to their degradation and bioactivities. Reproductive Physiology of Fish. Fish Symposium 91: 35–37.
- Guzmán, J.M., Ramos, J., Mylonas, C.C., Mañanós, E.L., 2009. Spawning performance and plasma levels of GnRH α and sex steroids in cultured female Senegalese sole (*Solea senegalensis*) treated with different GnRH α -delivery systems. Aquaculture 291: 200–209.
- Hanel, L., Lusk, S., 2005. Ryby a mihule České republiky. Rozšíření a ochrana. ZO ČSOP, Vlašim, 447 s.
- Hochman, L., 1987. Coregonid aquaculture. Vodnany: RIFCH, Vodnany, 16 pp.
- Hulak, M., Rodina, M., Linhar, O., 2008. Characteristics of stripped and testicular Northern pike (*Esox lucius*) sperm: spermatozoa motility and velocity. Aquatic Living Resources 21: 207–212.
- Ibarra-Castro, L., Navarro-Flores, J., Sánchez-Téllez, J.L., Martínez-Brown, J.M., Ochoa-Bojórquez, L.A., Rojo-Cebreros, A.H., 2017. Hatchery production of pacific white snook at CIAD-Unity Mazatlan, Mexico. World Aquaculture 48: 25–29.
- Kallert, D.M., 2009. Der Einfluss exogener und endogener Parameter auf den Erbrütungserfolg bei Salmoniden. Bezirk Oberfranken, Bayreuth, Německo, 144 pp.
- Knowles, J., Podhorec, P., 2020. Indukce ovulace pomocí přípravků na bázi PLGA mikročastic s mGnRH α u candáta obecného (*Sander lucioperca*). Edice Metodik, FROV JU, Vodňany, č. 175, 29 s.
- Kouril, J., Linhart, O., 1997. Temperature effect on hormonally induced spawning in perch (*Perca fluviatilis*). Polskie Archiwum Hydrobiologii 44: 1–2.
- Kouřil, J., Policar, T., Podhorec, P., Stejskal, V., 2020. Hormonální stimulace vybraných druhů ryb k umělému a poloumělému výtěru. Edice Metodik, FROV JU, Vodňany, č. 176, 53 s.
- Křišťan, J., Alavi, S.M.H., Stejskal, V., Policar, T., 2013. Hormonal induction of ovulation in pikeperch (*Sander lucioperca* L.) using human chorionic gonadotropin (hCG) and mammalian GnRH analogue. Aquaculture International 21: 811–818.
- Kucska, B., Müller, T., Sari, J., Bodis, M., Bercsenyi, M., 2005. Successful growth of pike fingerlings (*Esox lucius* L.) on pellet at artificial condition. Aquaculture 246: 227–230.
- Kucharczyk, D., Kujawa, R., Murmurz, A., Skrzypczak, A., Wyzomirska, E., 1996a. Induced spawning in perch, *Perca fluviatilis* L. using carp pituitary extract and HCG. Aquaculture Research 27: 847–852.
- Kucharczyk, D., Kujawa, R., Murmurz, A., Skrzypczak, A., Wyzomirska, E., 1996b. Induced spawning in perch, *Perca fluviatilis* L. using carp pituitary extract and HCG. Aquaculture Research 27: 847–52.
- Lengyel, M., Kállai-Szabó, N., Antal, V., Laki, A.J., Antal, I., 2019. Microparticles, microspheres, and microcapsules for advanced drug delivery. Scientia Pharmaceutica 87: 20.
- Malinovskyi, O., Veselý, L., Blecha, M., Křišťan, J., Policar, T., 2018. The substrate selection and spawning behaviour of pikeperch *Sander lucioperca* L. broodstock under pond conditions. Aquaculture Research 49: 3541–3547.

VYUŽITÍ PŘÍPRAVKŮ NA BÁZI MIKROČÁSTIC S HORMONÁLNÍ SUBSTANCÍ V AKVAKULTUŘE

- Matoušek, J., Gebauer, T., Stejskal, V., 2020. Effect of weaning initiation time and feed pellet size on peled *Coregonus peled* (Gmelin 1789) larviculture. *Aquaculture Research* 51: 2150–2154.
- Mylonas, C., Tabata, Y., Langer, R., Zohar, Y., 1995. Preparation and evaluation of polyanhydride microspheres containing gonadotropin-releasing hormone (GnRH), for inducing ovulation and spermiation in fish. *Journal of Controlled Release* 35: 23–34.
- Mylonas, C.C., Zohar, Y., 2000. Use of GnRHa-delivery systems for the control of reproduction in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 10: 463–491.
- Mylonas, C.C., Zohar, Y., 2007. Promoting oocyte maturation, ovulation and spawning in farmed fish. In: *The Fish Oocyte*. Springer, Dordrecht, Netherlands, pp. 437–474.
- Mylonas, C.C., Fostier, A., Zanuy, S., 2010. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *General and Comparative Endocrinology* 165: 516–534.
- Peter, R., Yu, K., 1997. Neuroendocrine regulation of ovulation in fishes: basic and applied aspects. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 7: 173–197.
- Philipsen, A., Van der Kraak, G., 2008. Excellence fish: production of pikeperch in recirculating system. *Percid Fish Culture*. Presses Universitaires de Namur, Namur, Belgium, pp. 67.
- Purchase, C., Earle, P., 2012. Modifications to the IMAGEJ computer assisted sperm analysis plugin greatly improve efficiency and fundamentally alter the scope of attainable data. *Journal of Applied Ichthyology* 28: 1013–1016.
- Rahdari, A., Falahatkar, B., 2020. Induced-spawning of fish by hormone implantation. *Journal of Ornamental Aquatics* 7: 33–40.
- Rahdari, A., Gharaei, A., Ghaffri, M., 2014. Spawning latency period in hormonal induced reproduction of snow trout (*Schizothorax Zarudnyi* (Nikolskii, 1897)). *Iranian Journal of Biotechnology* 12: 61–65.
- Ruan, G., Feng, S.S., 2003. Preparation and characterization of poly (lactic acid)-poly (ethylene glycol)-poly (lactic acid)(PLA-PEG-PLA) microspheres for controlled release of paclitaxel. *Biomaterials* 24: 5037–5044.
- Saillant, E., Adams, N., Lemus, J.T., Franks, J.S., Zohar, Y., Stubblefield, J., Manley, C., 2021. First data on aquaculture of the Tripletail, *Lobotes surinamensis*, a promising candidate species for US marine aquaculture. *Journal of the World Aquaculture Society* 52: 582–594.
- Schreck, C.B., Contreras-Sanchez, W., Fitzpatrick, M.S., 2001. Effects of stress on fish reproduction, gamete quality, and progeny. *Aquaculture* 197: 3–24.
- Steffens, W., Geldhauser, F., Gerstner, P., Hilge, V., 1996. German experiences in the propagation and rearing of fingerling pikeperch (*Stizostedion lucioperca*). *Annales Zoologici Fennici* 33: 627–634.
- Stejskal, V., Matousek, J., Prokesova, M., Podhorec, P., Sebesta, R., Drozd, B., 2018. Combined effect of weaning time and co-feeding duration on growth and survival of peled *Coregonus peled* (Gmelin) larvae. *Aquaculture Nutrition* 24: 434–441.
- Sukumasavin, N., 2008. Principles of fish seed production. *Handbook on Community-based Aquaculture for Remote Rural Areas of Southeast Asia* Secretariat, Southeast Asian Fisheries Development Center, Bangkok, Thailand, pp. 60–75.
- Svinger, V.W., Kouril, J., 2014. Synchronization of ovulation in cultured northern whitefish (*Coregonus peled*, Gmelin 1788) using [D-Arg6Pro9Net] sGnRH analogue and its effect on egg quality. *Aquaculture Research* 45: 834–847.

- Szabó, T., 2001. Hormonally induced ovulation of northern pike via sustained-release vehicles. *North American Journal of Aquaculture* 63: 137–143.
- Szabó, T., 2008. Use of Carbolpol resin for carp pituitary administration improves the fertilization percentage of northern pike (*Esox lucius* Linnaeus) eggs in commercial hatcheries. *Hydrobiologia* 601: 91–97.
- Švinger, V., Bondarenko, V., Kallert, D., Policar, T., 2012. Influence of two ways of pituitary administration on egg quality in Northern pike (*Esox lucius*). *Bulletin VÚRH Vodňany* 48: 21–33.
- Švinger, V.W., Kouřil, J., 2012. Hormonálně řízená reprodukce lososovitých ryb. Edice Metodik, FROV JU, Vodňany, č. 123, 54 s.
- Teletchea, F., Gardeur, J.N., Psenicka, M., Kaspar, V., Le Doré, Y., Linhart, O., Fontaine, P., 2009. Effects of four factors on the quality of male reproductive cycle in pikeperch *Sander lucioperca*. *Aquaculture* 291: 217–223.
- Vazirzadeh, A., Amiri, B.M., Yelghi, S., Hajimoradloo, A., Nematollahi, M.A., Mylonas, C.C., 2011. Comparison of the effects of different methods of mammalian and salmon GnRH α administration on spawning performance in wild-caught female carp (*Cyprinus carpio carpio*) from the Caspian Sea. *Aquaculture* 320: 123–128.
- Wang, N., Xu, X., Kestemont, P., 2009. Effect of temperature and feeding frequency on growth performances, feed efficiency and body composition of pikeperch juveniles (*Sander lucioperca*). *Aquaculture*. 289: 70–73.
- Weil, C., Crim, L., 1983. Administration of LHRH analogues in various ways: effect on the advancement of spermiation in prespawning landlocked salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture* 35: 103–115.
- Wilson-Leedy, J.G., Ingermann, R.L., 2007. Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. *Theriogenology* 67: 661–672.
- Žarski, D., Horváth, A., Held, J., Kucharczyk, D., 2015. Artificial reproduction of percid fishes. In: *Biology and culture of percid fishes*. Springer, Dordrecht, Netherlands, pp. 123–161.
- Žarski, D., Kucharczyk, D., Targońska, K., Palińska, K., Kupren, K., Fontaine, P., Kestemont, P., 2012. A new classification of pre-ovulatory oocyte maturation stages in pikeperch, *Sander lucioperca* (L.), and its application during artificial reproduction. *Aquaculture Research* 43: 713–721.
- Žarski, D., Fontaine, P., Roche, J., Alix, M., Blecha, M., Broquard, C., Król, J., Milla, S., 2019. Time of response to hormonal treatment but not the type of a spawning agent affects the reproductive effectiveness in domesticated pikeperch, *Sander lucioperca*. *Aquaculture* 503: 527–536.
- Zohar, Y., 1996. New approaches for the manipulation of ovulation and spawning in farmed fish. *Bulletin of the National Research Centre* 2: 43–48.
- Zohar, Y., Mylonas, C.C., 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture* 197: 99–136.

Odborný externí oponent

Ing. Viktor Schwinger, Ph.D.

*Fachberatung für Fischerei des Bezirks Oberfranken, Cottenbacher Str. 23,
95445 Bayreuth, Germany*

Odborný interní oponent

Ing. Vojtěch Kašpar, Ph.D.

*Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod,
Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz, Výzkumný ústav
rybářský a hydrobiologický, Zátíší 728/II, 389 25 Vodňany, www.frov.jcu.cz*

Ověření a uplatnění technologie 2021

ŠTIČÍ LÍHEŇ – ESOX, Jordánská 366/1, 39001 Tábor

Adresa autorského kolektivu

*Ing. Jindřiška Knowles (90 %), Mgr. Peter Podhorec, Ph.D. (5 %), Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Jihočeské výzkumné centrum
akvakultury a biodiverzity hydrocenóz, Ústav akvakultury a ochrany vod,
Na Sádkách 1780, 370 05 České Budějovice, www.frov.jcu.cz*

*PharmDr. Jakub Vysloužil, Ph.D. (5 %), Masarykova univerzita, Farmaceutická fakulta,
Ústav farmaceutické technologie, Palackého třída 1946/1, 612 00 Brno,
www.pharm.muni.cz*

*V edici Metodik (Technologická řada) vydala Jihočeská univerzita v Českých
Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Vodňany, www.frov.jcu.cz, odborný editor:
doc. Ing. Antonín Kouba, Ph.D.; redakce: Zuzana Dvořáková, náklad: 200 ks, 1. vydání,
vytištěno v roce 2022.*

Grafický design a technická realizace: Jesenické nakladatelství Jena Šumperk.