

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
FAKULTA RYBÁŘSTVÍ A OCHRANY VOD**

**Hormonální stimulace spermiace reofilních druhů  
jesetera malého a parmičky žraločí pomocí PLGA  
mikročástečkových systémů s řízeným uvolňováním  
gonadoliberinu**

**Autoři**

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

**č. 194**

**Vodňany**

*ISBN 978-80-7514-142-2*





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%)**

## Obsah:

### 1. Cíl metodiky

Optimalizace hormonální stimulace spermiace modelových druhů reofilních ryb - jesetera malého (*Acipenser ruthenus*) a parmičky žraločí (*Balantiocheilos melanopterus*) pomocí mikročásticových 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.

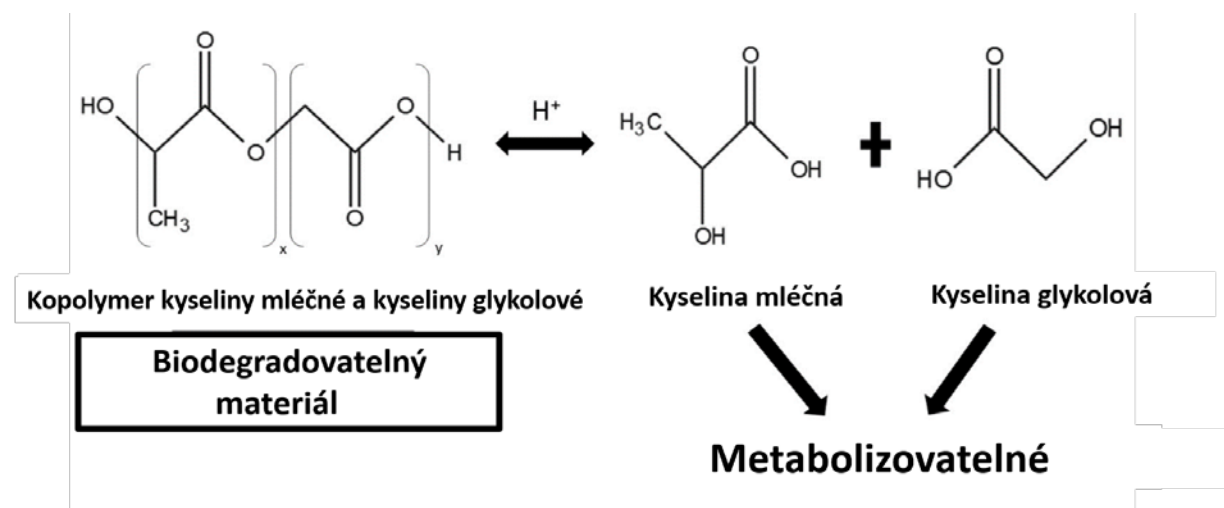
Potřeba hormonálně vyvolané umělé reprodukce je založena na neschopnosti reofilních druhů ryb podstoupit finální zrání gamet v kontrolovaných podmínkách <sup>1</sup> nebo potřebě synchronizace zrání samčích a samičích gamet. Absencí finálního zrání gamet jsou v zajetí postiženy hlavně samice reofilních druhů <sup>2</sup>, 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 <sup>3</sup>. Historicky nejstarším řešením této reprodukční dysfunkce byla aplikace preparátů založena na aplikaci exogenního luteinizačního hormonu (LH), např. ve formě kapří hypofýzy <sup>4</sup>. Objev gonadoliberinu (GnRH) jakožto ústředního regulátora reprodukční kaskády a následná syntéza superaktivních GnRH analogů (GnRHa), umožnilo vzniknout účinné reprodukční terapie u ryb. Jednou z významných výhod neuropeptidu GnRHa 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 <sup>5</sup>. Po podání dosáhne koncentrace peptidu v plazmě svého maxima a poté v průběhu desítek minut až několika hodin velmi rychle klesá <sup>6</sup>. K dlouhodobému udržení efektivní hladiny GnRHa je proto zapotřebí opakovaného podání, jinak klesá plazmatická koncentrace peptidu pod účinnou hladinu. Řešením jsou systémy s řízeným uvolňováním, umožňující dlouhodobé a kontrolované uvolňování účinné látky <sup>7</sup>. 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) <sup>7</sup>. 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 <sup>8</sup>. Aplikace systémů s řízeným uvolňováním vedla u těchto druhů ryb k úspěšné stimulaci spermatogeneze <sup>7, 9</sup>. V případě sladkovodní akvakultury nevedly dosud publikované pokusy s řízeným uvolňováním GnRHa k významnému zlepšení spermiace u

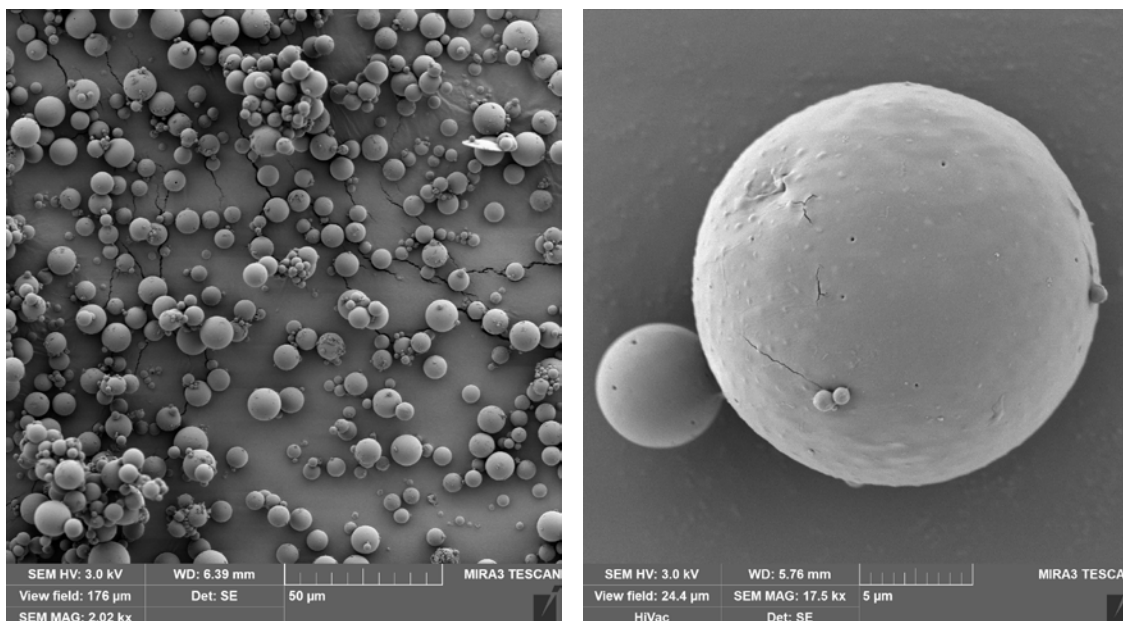
studovaných druhů <sup>10, 11</sup>. Námi předkládaná metodika popisuje pro akvakulturu reofilních druhů ryb inovativní postup stimulace spermiace formou PLGA mikročasticových systémů s řízeným uvolňováním mGnRHa. PLGA mikročasticový systém s řízeným uvolňováním mGnRHa je možné zakoupit na Ústavu farmaceutické technologie v Brně (Farmaceutická fakulta, Masarykova univerzita, PharmDr. Jakub Vysloužil, Ph.D.).

## 2.2. PLGA mikročasticový 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  $\mu\text{m}$  (Obr. 3 a Obr. 4). PLGA mikročastice se vyznačují vysokou úrovní biokompatibility a biodegradability <sup>12</sup> a v organismu se rozkládají na organismu přirozenou kyselinu mléčnou a kyselinu glykolovou (Obr. 1). Mikročastice mají homogenní vnitřní strukturu bez obalu, tvořenu polymerem s rovnoměrně rozprostřenou aktivní látkou s excipienty <sup>12</sup>. Výhodou mikročastic je jejich vícedílný charakter, tzn., léčivá látka je distribuována v mnoha malých samostatných mikročasticích. Díky tomu je léčivá látka rovnoměrněji rozmístěna v místě aplikace a při případném selhání jedné jednotky nedochází k selhání celé dávky <sup>13</sup>. PLGA mikročastice s hydrofilním neuropeptidem mGnRHa jsou syntetizovány tzv. metodou odpaření rozpouštědla za využití dvojité emulze. Charakteristickým rysem využívaných PLGA mikročastic je kinetika uvolňování GnRHa, představovaná počátečním uvolněním signifikantního množství léčiva krátce po aplikaci s následným graduálním poklesem do vyčerpání zásoby léčiva (Obr. 5). PLGA mikročastice jsou aplikovány formou kapalně suspenze, což umožňuje přesné dávkování i menším druhům ryb, na bázi objem versus hmotnost ryby. Přesné dávkování PLGA mikročastic je velkou výhodou oproti jiným systémům s řízeným uvolňováním, kdy je velikost systému resp. implantátu pevně daná (<sup>7</sup>).



**Obr. 1.** Degradace PLGA v rybím organismu



**Obr. 2.** Snímek vzorku mikročastic ze skenovacího elektronového mikroskopu (Měřítka 50  $\mu\text{m}$ ); (Foto: J. Vysloužil)

**Obr. 3.** Snímek PLGA mikročastice ze skenovacího elektronového mikroskopu (Měřítka 5  $\mu\text{m}$ ); (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 léčivá forma má pak matricový charakter. Jako hormonálně účinné látky inkorporovatelné do PLGA kopolymeru se využívají analogy gonadoliberinu, v námi využitých 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 (Penta, Česká republika). Obsah se uzavře a ponechá k samovolnému rozpuštění. Vnitřní vodná fáze se připraví rozpuštěním želatiny v čištěné vodě při 65 °C (10 %; Sigma Aldrich, USA). 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 se naváží 10 mg mGnRHa a pomocí stříkačky se přidá 1,5 ml 10% roztoku želatiny. Obsah se za pomoci vortexu řádně promíchá, aby se léčivo rozpustilo. Výsledný roztok se poté nalije do širší skleněné zkumavky, ve které byla již předtím připravena olejová fáze rozpuštěním příslušného PLGA polymeru (800 mg/5 g). Směs se důkladně promíchá pomocí vortexu (30 sekund), aby byla zajištěna primární emulgace. Tím se vytvoří primární emulze voda/olej. Ta se následně promíchává po dobu 1 minuty za použití homogenizátoru (T25 basic, IKA-Werke, Německo). Díky tomu vzniknou mnohem menší kapičky dispergované fáze a vytvoří se tak velmi jemná emulze. Následně se do zkumavky přidá 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 se poté přidá 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 se nepřetržitě míchá 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 se provede kontinuální centrifugací (6 000 ot / min; 2 minuty). Přebytečná voda se dekantuje a mikročástice sesbírají na Petriho misky a uloží v mrazícím boxu při – 20 °C. Zbývající voda se poté vysuší 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)*

#### **2.5. Doporučené dávkování PLGA mikročasticových systémů s řízeným uvolňováním mGnRHa.**

Optimální výše dávky PLGA mikročasticových systémů indukující zvýšenou spermiaci modelových druhů reofilních ryb se pohybuje v rozmezí 10 až 35  $\mu\text{g}$  mGnRHa (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 navážíme na analytických vahách příslušné množství PLGA mikročastic, které krátce před aplikací naředíme fyziologickým roztokem. Při ředění PLGA mikročastic doporučujeme zachovávat poměr 1 ml léčebné suspenze na 1 kg ryb u kusové hmotnosti ošetřovaných jedinců  $\leq 2$  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 aby se zamezilo sedimentaci PLGA mikročastic na dně kádinky (Obr. 8). Pro injekci suspenze je vhodné využívat jehly o průměru 1,2 mm (růžová barva), (Obr. 9), 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 - 7.** Homogenizace PLGA mikročastic s fyziologickým roztokem pomocí mobilního vortexu, krátce před injekční aplikací pomocí 1,2 mm 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“ (Peter a Yu, 1997), citlivě reagující a konstantně vyhodnocující 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 vedoucímu 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, začneme postupně zvyšovat teplotu vody (maximální denní nárůst o 1 °C) na finální hodnotu 14-15°C. Tuto teplotu udržujeme 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. 10).



**Obr. 8.** Akvárium se samci parmičky žraločí v před-výtěrové 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 parmičky žraločí bylo kvůli kontaminace močí sperma odebíráno injekční stříkačkou obsahující 2,5 ml imobilizačního roztoku (180mM NaCl, 2,8mM KCl, 1,36mM CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O and 2,38mM NaHCO<sub>3</sub>). V případě jesetera malého bylo sperma odebíráno pomocí kanyly vhodného průměru (jesetera malého 4–5 mm), a to pouhým vycévkováním do sběrné nádobky (Obr. 11).



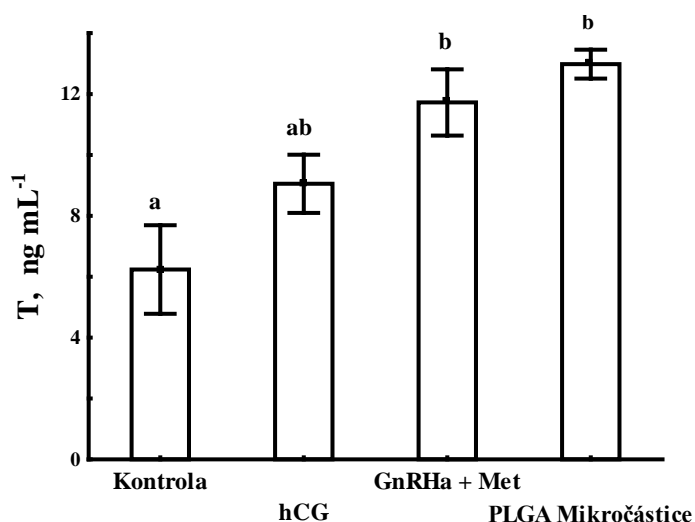
**Obr. 9.** Anestezie samců pamičky žraločí (Foto: P. Podhorec)



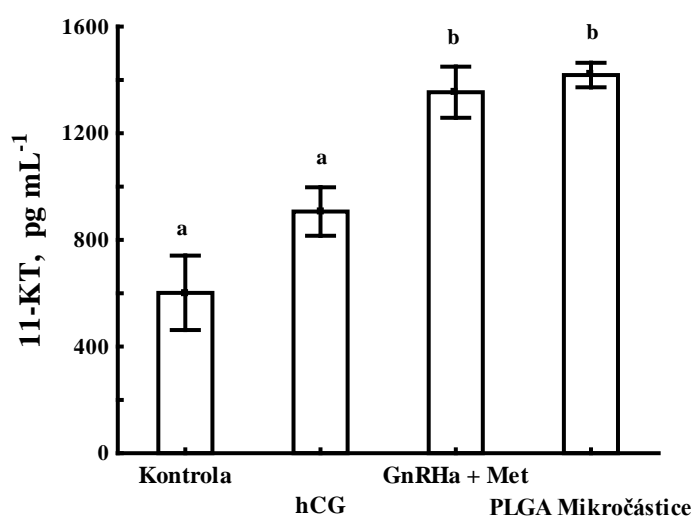
**Obr. 10.** Odběr spermatu jesetera malého (Foto: P. Šablatura)

### **2.9. Hormonální odezva rybího organismu po ošetření PLGA mikročásticovým systémem s řízeným uvolňováním mGnRH $\alpha$**

V přirozeném prostředí volných vod dochází v před-výtěrové a výtěrové periodě u samců 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) <sup>14</sup> 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 <sup>15 2</sup>. 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. 12-15.

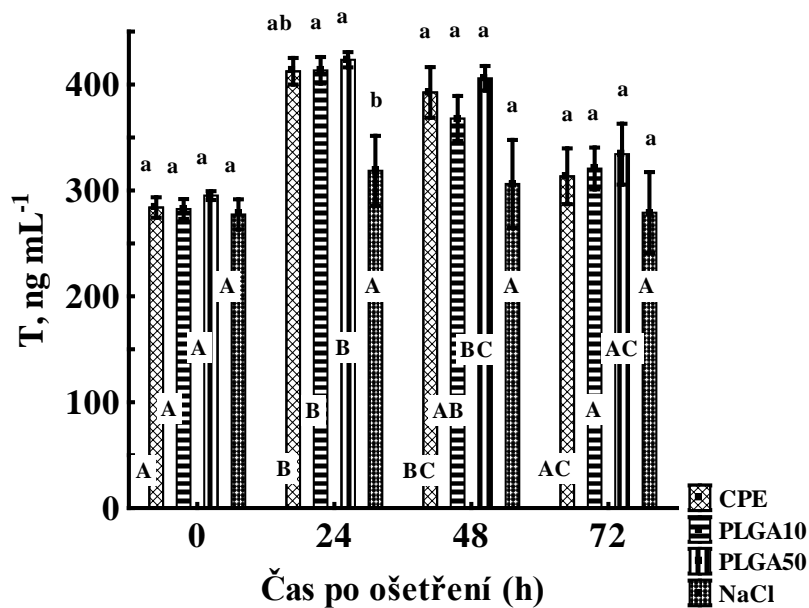


**Obr. 11.** Koncentrace testosteronu v krevní plazmě samců parmičky žraločí 24h po aplikaci hormonálního ošetření: Kontrola – 0,9% NaCl, hCG – 500 I.U., GnRHα + Met - mGnRHα (25  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) + Metoklopramid (20  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), PLGA mikročástice – 8,3 mg (10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

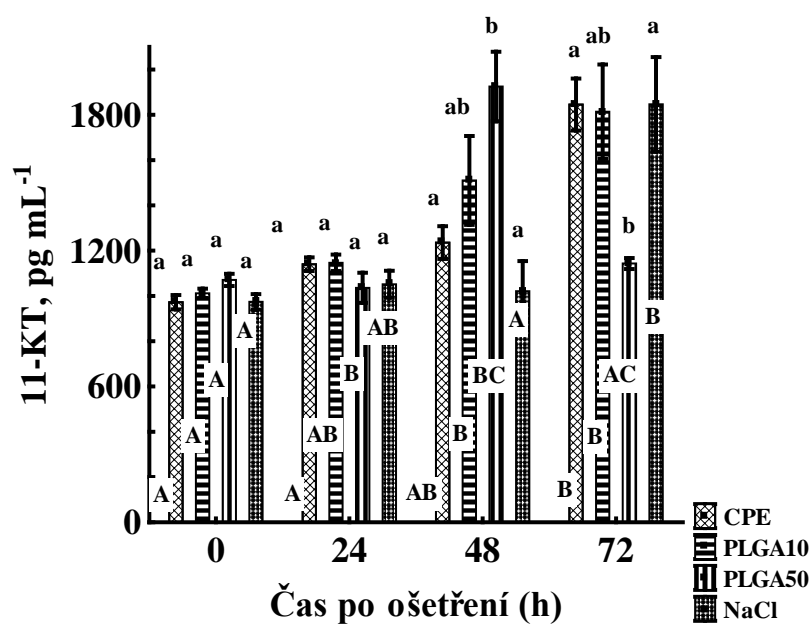


**Obr. 12.** Koncentrace 11-ketotestosteronu v krevní plazmě samců parmičky žraločí 24h po aplikaci hormonálního ošetření: Kontrola – 0,9% NaCl, hCG – 500 I.U., GnRHα + Met - mGnRHα (25  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) + Metoklopramid (20  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), PLGA mikročástice – 8,3 mg (10  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). 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 mGnRHα versus akutně působící preparát mGnRHα s metoklopramidem.



**Obr. 13.** Koncentrace testosteronu v krevní plazmě samců jesetera malého po aplikaci hormonálních ošetření: CPE – kapří hypofýza ( $4 \text{ mg.kg}^{-1}$ ), PLGA 10 -  $8,3 \text{ mg PLGA}$  mikročásteček ( $35 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}$ ), PLGA 50 -  $165 \text{ mg PLGA}$  mikročásteček ( $200 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}$ ), NaCl -  $0,9\% \text{ NaCl}$ . 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 ( $P < 0,05$ ).

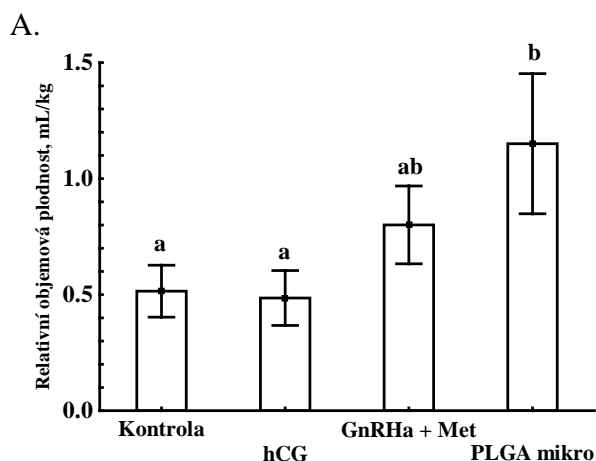


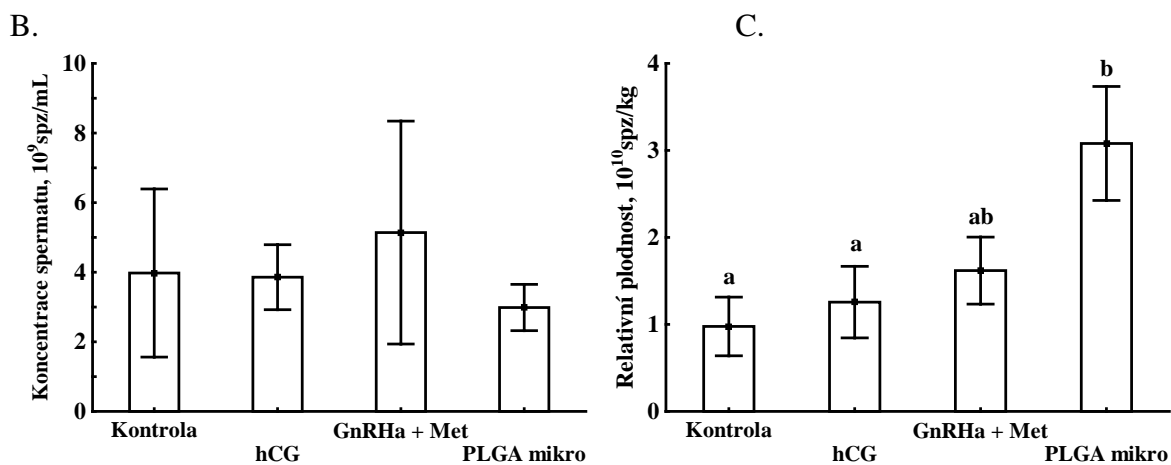
**Obr. 14.** Koncentrace 11-ketotestosteronu v krevní plazmě samců jesetera malého po aplikaci hormonálních ošetření: CPE – kapří hypofýza ( $4 \text{ mg.kg}^{-1}$ ), PLGA 10 - 8,3 mg PLGA mikročástic ( $35 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}$ ), PLGA 50 - 165 mg PLGA mikročástic ( $200 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}$ ), 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 ( $P < 0,05$ ).

Aplikace PLGA mikročásticového 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 mikročásticovým systémem s řízeným uvolňováním mGnRHa

Pozitivní efekt PLGA mikročásticového 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 mikročásticového systému vedla u modelových druhů reofilních ryb k dosažení následovných parametrů (Obr. 16 - 21).

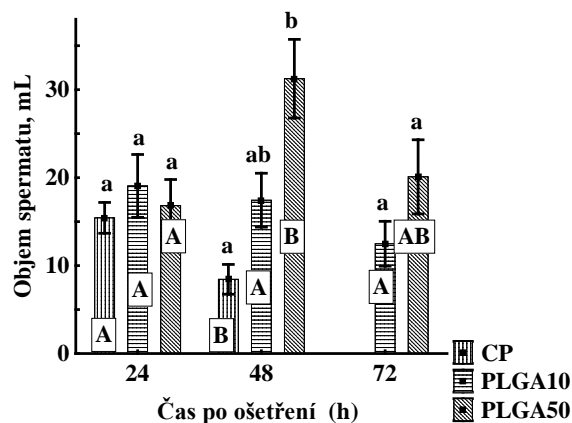




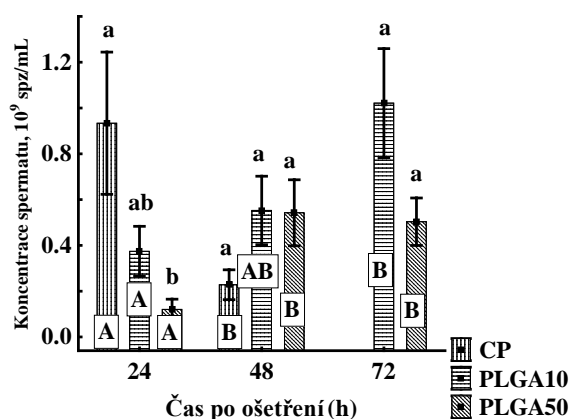
**Obr. 15 – 17.** Parametry spermatu pamičky žraločí, odebrané 24h po aplikaci PLGA mikročastic: A - Relativní objemová plodnost samce, B - Koncentrace spermií ve spermatu, C – Relativní plodnost samce. Kontrola – 0,9% NaCl, hCG – 500 I.U hCG., GnRha + Met - ( $25 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ) mGnRHa + Metoklopramid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

Jako jediné z testovaných hormonálních ošetření vedla aplikace PLGA mikročasticového systému u pamičky 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 nežli výsledky 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 Cypriniformes a efektivně indukovat zvýšenou spermiaci ošetřeného reofilního druhu.

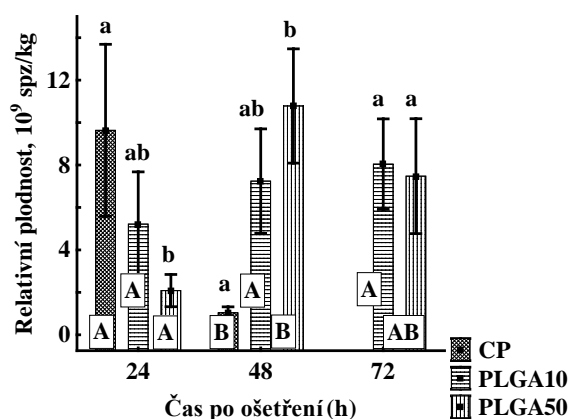
A.



B.



C.

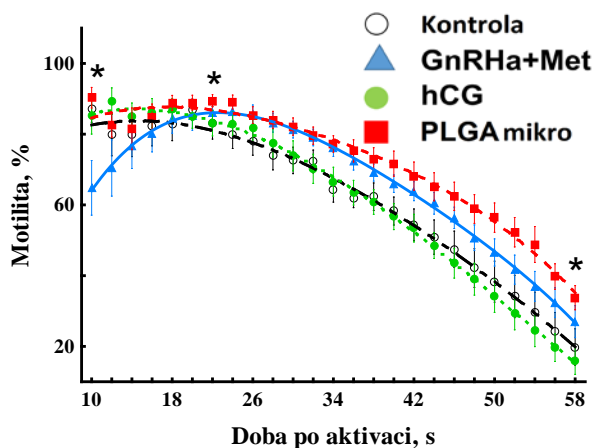


**Obr. 18 - 20.** Parametry spermatu jesetera malého v průběhu experimentu: A - Objem spermatu, B - Koncentrace spermií ve spermatu, C – Relativní plodnost samce. CPE – kapří hypofýza ( $4 \text{ mg.kg}^{-1}$ ), PLGA 10 -  $8,3 \text{ mg PLGA mikročástic } (35 \mu\text{g.kg}^{-1})$ , PLGA 50 -  $165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

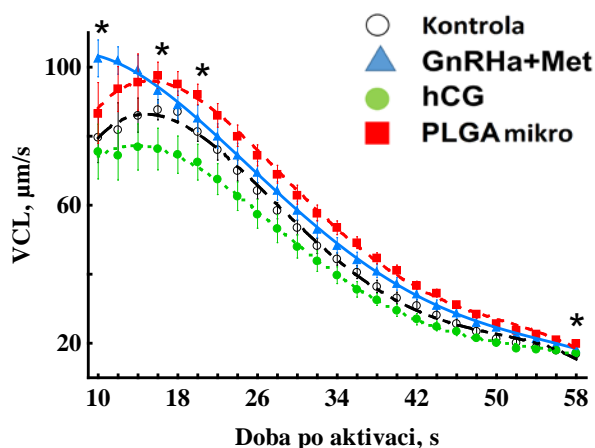
Předložená data poukazují na významné prodloužení doby odběru spermatu a možnosti získání signifikantně většího množství spermatu jesetera malého po aplikaci PLGA mikročástic, nežli je tomu po podání standardního ošetření kapří hypofýzou. Na základě získaných dat se ukázala být stimulace pomocí mGnRHa ( $35 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ) uvolňovaného z PLGA mikročástic jako nejúčinnější ošetření. Po aplikaci této koncentrace se dosáhlo 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 signifikantně neodlišují 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 mikročasticovým 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<sup>6</sup>. Aplikace PLGA mikročasticových 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. 22 - 27.

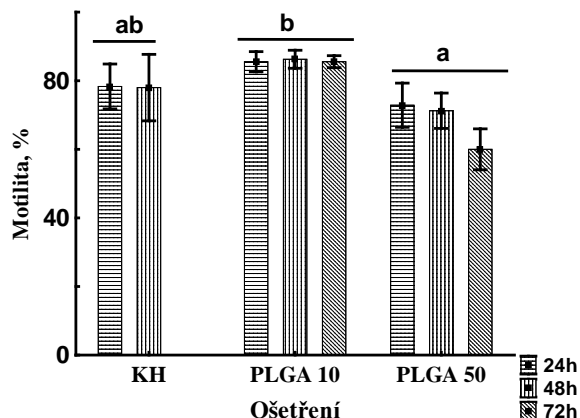


**Obr. 21.** Průběh motility spermií pamičky žraločí po aktivaci pohyblivosti. Data jsou prezentována jako průměr a směrodatná odchylka (chybová úsečka). Kontrola – 0,9% NaCl, hCG – 500 I.U., GnRH+ Met - mGnRH<sub>a</sub> (25  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) + Metoklopramid (20  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$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

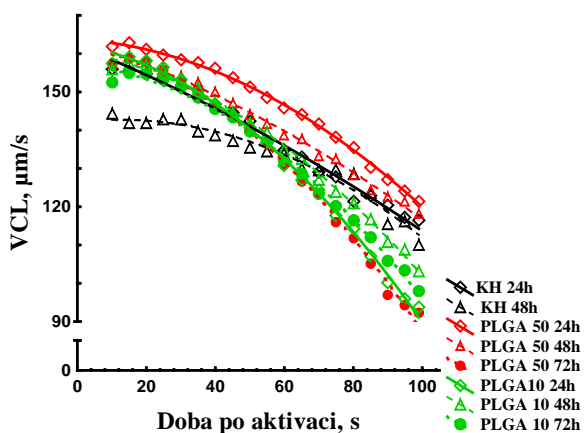


**Obr. 22.** Křivočarý průběh rychlosti (VCL,  $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ) pohybu spermií pamičky žraločí po aktivaci. Kontrola – 0,9% NaCl, hCG – 500 I.U., GnRH+ Met - mGnRH<sub>a</sub> (25  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) + Metoklopramid (20  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), PLGA mikro -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

Aplikace PLGA mikročasticového systému s řízeným uvolňováním mGnRHa 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 mGnRHa 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 ( $4 \text{ mg.kg}^{-1}$ ), PLGA 10 -  $8,3 \text{ mg PLGA mikročastic } (35 \mu\text{g.kg}^{-1})$ , PLGA 50 -  $165 \text{ mg PLGA mikročastic } (200 \mu\text{g.kg}^{-1})$ . 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 ( $\mu\text{m.s}^{-1}$ ) pohybu spermií jesetera malého po aktivaci pohybu. KH – kapří hypofýza ( $4 \text{ mg.kg}^{-1}$ ), PLGA 10 -  $8,3 \text{ mg PLGA mikročastic } (35 \mu\text{g.kg}^{-1})$ , PLGA 50 -  $165 \text{ mg PLGA mikročastic } (200 \mu\text{g.kg}^{-1})$ .

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

## Shrnutí

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

### 3. Srovnání „novosti postupů“

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

### 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 možností opakovaného výtěru málo početných samců cenných druhů reofilních ryb nebo eliminací nutnosti využívání antagonistů dopaminu v reprodukci reofilních druhů ryb.

V případě modelové kalkulace se například získáním možnosti vícenásobného využití spermatu u samců cenného druhu jesetera blíží potenciální zisk k vyšším desetitisícům českých korun.

### 6. Seznam použité související literatury

1. Podhorec, P.; Kouril, J., Induction of final oocyte maturation in Cyprinidae fish by hypothalamic factors: a review. *Veterinarni Medicina* **2009**, *54* (3), 97-110.
2. Mylonas, C. C.; Fostier, A.; Zanuy, S., Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *Gen Comp Endocr* **2010**, *165* (3), 516-534.
3. Zohar, Y.; Mylonas, C. C., Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture* **2001**, *197* (1-4), 99-136.
4. Yaron, Z.; Bogomolnaya, A.; Drori, S.; Biton, I.; Aizen, J.; Kulikovskiy, Z.; Levavi-Sivan, B., Spawning Induction in the Carp: Past Experience and Future Prospects - A Review. *Isr J Aquacult-Bamid* **2009**, *61* (1), 5-26.
5. Zohar, Y.; Goren, A.; Tosky, M.; Pagelson, G.; Leibovitz, D.; Koch, Y., THE BIOACTIVITY OF GONADOTROPIN-RELEASING HORMONES AND ITS REGULATION IN THE GILTHEAD SEABREAM, SPARUS-AURATA - INVIVO AND INVITRO STUDIES. *Fish Physiol Biochem* **1989**, *7* (1-6), 59-67.

6. Mylonas, C. C.; Duncan, N. J.; Asturiano, J. F., Hormonal manipulations for the enhancement of sperm production in cultured fish and evaluation of sperm quality. *Aquaculture* **2017**, *472*, 21-44.
  7. Mylonas, C. C.; Zohar, Y., Use of GnRHa-delivery systems for the control of reproduction in fish. *Rev Fish Biol Fisher* **2001**, *10* (4), 463-491.
  8. Mylonas, C. C.; Scott, A. P.; Vermeirssen, E. L. M.; Zohar, Y., 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. *Biol Reprod* **1997**, *57* (3), 669-675.
  9. Rainis, S.; Mylonas, C. C.; Kyriakou, Y.; Divanach, P., Enhancement of spermiation in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) at the end of the reproductive season using GnRHa implants. *Aquaculture* **2003**, *219* (1-4), 873-890.
  10. Alavi, S. M. H.; Hatef, A.; Mylonas, C. C.; Gela, D.; Papadaki, M.; Rodina, M.; Kaspar, V.; Psenicka, M.; Podhorec, P.; Linhart, O., Sperm characteristics and androgens in *Acipenser ruthenus* after induction of spermiation by carp pituitary extract or GnRHa implants. *Fish Physiol Biochem* **2012**, *38* (6), 1655-1666.
  11. Linhart, O.; Peter, R. E.; Rothbard, S.; Zohar, Y.; Kvasnicka, P., Spermiation of Common Tench (*Tinca-Tinca* L) Stimulated with Injection or Implantation of GnRh Analogs and Injection of Carp Pituitary Extract. *Aquaculture* **1995**, *129* (1-4), 119-121.
  12. Han, F. Y.; Thurecht, K. J.; Whittaker, A. K.; Smith, M. T., Bioerodable PLGA-Based Microparticles for Producing Sustained-Release Drug Formulations and Strategies for Improving Drug Loading. *Front Pharmacol* **2016**, *7*.
  13. Lengyel, M.; Kallai-Szabo, N.; Antal, V.; Laki, A. J.; Antal, I., Microparticles, Microspheres, and Microcapsules for Advanced Drug Delivery. *Sci Pharm* **2019**, *87* (3).
  14. Koya, Y.; Watanabe, H.; Soyano, K.; Ohta, K.; Aritaki, M.; Matsubara, T., Testicular development and serum steroid hormone levels in captive male spotted halibut *Verasper variegatus*. *Fisheries Sci* **2003**, *69* (4), 792-798.
  15. Mañanós, E.; Duncan, N.; Mylonas, C., Reproduction and control of ovulation, spermiation and spawning in cultured fish In *Methods in reproductive aquaculture. Marine and freshwater species*, Cabrita, E.; Robles, V.; Herráez, P., Eds. CRC Press: 2008; pp 3-80.
- Radinová, Eva. (2021). Reprodukovatelnost přípravy mikročastic s obsahem alarelinu a příprava vzorků mikročastic s obsahem leuprorelinu a kumarinu. Diplomová práce, Masarykova univerzita, 114 ss

## 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**: 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**

Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu NAZV č. QK1920326 s názvem „Akvakultura reofilních druhů ryb“ (100 %).

### **Externí odborný oponent**

**Ing. Miroslav Blecha, Ph.D.**

Dvůr Lnáře, spol. s r.o., Lnáře 18, 387 42 Lnáře

### **Interní odborný oponent**

**Ing. Vojtěch Kašpar, Ph.D.**

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybnářství a ochrany vod, Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz, Výzkumný ústav rybnářský a hydrobiologický, Zátíší 728/II, 389 25 Vodňany, [www.frov.jcu.cz](http://www.frov.jcu.cz)

### **Oponent za státní správu**

**Ing. Aleš Řezníček**

Ministerstvo zemědělství ČR, Odbor státní správy lesů, myslivosti a rybnářství, Oddělení rybnářství a včelařství, Těšnov 65/17, 110 00 Praha 1

### **Osvědčení o uplatněné certifikované metodice č. ze dne**

vydalo Ministerstvo zemědělství ČR, Odbor státní správy lesů, myslivosti a rybnářství, Oddělení rybnářství a včelařství, Těšnov 65/17, 110 00 Praha 1

### **Adresa autorského kolektivu**

Mgr. Peter Podhorec, Ph.D., Ing. Jindřiška Knowles, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybnářství 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](http://www.frov.jcu.cz)

doc. MSc. Borys Dzyuba, Ph.D., Mgr. Sergii Boryshpolets, Ph.D., Ing. Marek Rodina, Ph.D., Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybnářství a ochrany vod, Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz, Výzkumný ústav rybnářský a hydrobiologický, Zátíší 728/II, 389 25 Vodňany, [www.frov.jcu.cz](http://www.frov.jcu.cz)

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

V edici Metodik (technologická řada) vydala Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybnářství a ochrany vod, Vodňany, [www.frov.jcu.cz](http://www.frov.jcu.cz); přidělený editor: prof. Ing. Martin Flajšhans, Dr.rer.agr.; redakce: Zuzana Dvořáková náklad: 200 ks, 1. vydání; metodika uplatněna v roce 2021; vytištěna v roce 2022; grafický design a technická realizace:.

v y d á v á

## OSVĚDČENÍ

č.j. MZE - 69286/2021 - 16232

N<sub>met</sub> - Certifikovaná metodika

o uznání metodiky v souladu s podmínkami Metodiky hodnocení výzkumných organizací a programů účelové podpory výzkumu, vývoje a inovací, schválené usnesením vlády dne 8. února 2017, číslo 107 a její samostatné přílohy č. 4 schválené usnesením vlády dne 29. listopadu 2017 č. 837.

Název metodiky: **Hormonální stimulace spermiace reofilních druhů jesetera malého a parmičky žraločí pomoci PLGA mikročásticových systémů s řízeným uvolňováním gonadoliberinu**

Autor / autoři: **Mgr. Peter Podhorec, Ph.D., Ing. Jindřiška Knowles, doc. MSc. Borys Dzyuba, Ph.D., Mgr. Sergii Boryshpolets, Ph.D., Ing. Marek Rodina, Ph.D., PharmDr. Jakub Vysloužil, Ph.D.**

Název organizací: **Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz,**  
**Masarykova univerzita, Farmaceutická fakulta, Ústav farmaceutické technologie**

Místo vydání: Vodňany

Rok vydání: 2021

Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu NAZV č. QK1920326 s názvem „Akvakultura reofilních druhů ryb“(100 %).

Využívá projekt „Pravidla pro odvětví zemědělství, lesnictví, rybolov“? ANO


V případě, že projekt využívá „Pravidla pro odvětví zemědělství, lesnictví a rybolovu“, je výsledek typu N<sub>met</sub> zdarma k dispozici všem zájemcům na webové stránce: [www.frov.jcu.cz](http://www.frov.jcu.cz)

V Praze dne 20 -12- 2021

Jméno zástupce odborného útvaru státní správy:  
Funkce zástupce odborného útvaru státní správy:




Ing. Martin Žižka, Ph.D.  
ředitel Odboru státní správy  
lesů, myslivosti a rybářství



Podpis zástupce odborného útvaru státní správy

Potvrzení ředitele Odboru vědy, výzkumu a vzdělávání MZe:

V .....Praze..... dne 23. 12. 2011  .....

Mgr. Jan Radoš