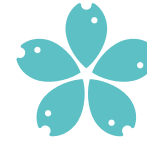




Fakulta rybnářství  
a ochrany vod  
Faculty of Fisheries  
and Protection  
of Waters

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

---

## Indukce ovulace pomocí přípravků na bázi PLGA mikročástic s mGnRH $\alpha$ u candáta obecného (*Sander lucioperca*)

---

J. Knowles, P. Podhorec



ISBN 978-80-7514-122-4







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

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

# **Indukce ovulace pomocí přípravků na bázi PLGA mikročásteč s mGnRHa u candáta obecného (*Sander lucioperca*)**

---

J. Knowles, P. Podhorec

**Vodňany**



EVROPSKÁ UNIE  
Evropský námořní a rybářský fond  
Operační program Rybářství

***Příprava a vydání publikace byly uskutečněny v rámci***

***Operačního programu Rybářství 2014–2020:***

*Projekt Technologie VI, reg. č. CZ.10.5.109/5.2/4.0/19\_014/0000898  
byl spolufinancován Evropskou unií*

***Obsahová část publikace byla zpracována***

***za finanční podpory následujících projektů:***

*MŠMT projektu CENAKVA (CZ.1.05/2.1.00/01.0024) a projektu CENAKVA II  
(LO1205 v rámci programu NPU I) (5 %)*

*Optimalizace chovatelských aspektů rybníční a intenzivní akvakultury  
(GAJU 074/2013/Z) (5 %)*

*NAZV projekt č. QK1810221 – Využití mikročástic jako nosičů hormonálně  
aktivních látek v řízené reprodukci ryb (90 %)*



č.175

ISBN 978-80-7514-122-4

<b>1.</b>	<b>ÚVOD DO PROBLEMATIKY</b>	<b>7</b>
1.1.	Současný stav a statut	7
1.2.	Biologie candáta obecného	7
1.3.	Neuroendokrinní řízení reprodukce	8
1.4.	Kvalita gamet	9
1.5.	Současné metody řízení reprodukce u candáta	10
1.6.	Řízené uvolňování GnRHa při reprodukci ryb pomocí implantátů	12
1.7.	PLGA mikročástice	13
<b>2.</b>	<b>CÍL</b>	<b>14</b>
<b>3.</b>	<b>MÍSTO OVĚŘENÍ TECHNOLOGIE</b>	<b>14</b>
<b>4.</b>	<b>POPIS TECHNOLOGIE A VÝSLEDKY</b>	<b>14</b>
4.1.	<b>Materiál a metodický postup</b>	<b>15</b>
4.1.1.	Příprava PLGA mikročástic	15
4.1.2.	Generační ryby	16
4.1.3.	Injikace generačních ryb	17
4.1.4.	Umělý výtěr	19
4.1.5.	Odběr a analýza krevních vzorků	20
4.1.6.	Statistické vyhodnocení	22
4.2.	<b>Výsledky</b>	<b>22</b>
4.2.1.	Ovulace a doba latence	22
4.2.2.	Plodnost a líhivost	23
4.2.3.	Hormonální odpověď organismu	24
<b>5.</b>	<b>EKONOMICKÝ PŘÍNOS</b>	<b>26</b>
<b>6.</b>	<b>UPLATNĚNÍ TECHNOLOGIE V PRAXI</b>	<b>26</b>
<b>7.</b>	<b>SEZNAM LITERATURY</b>	<b>27</b>



## 1. ÚVOD DO PROBLEMATIKY

### 1.1. Současný stav a statut

Candát obecný (*Sander lucioperca*) je v současnosti velmi perspektivním druhem sladkovodní akvakultury. Celková produkce tržního candáta je v Evropě tvořena z 85–90 % lovem z volných vod (Dil a Teletchea, 2008). Ryby nejčastěji pocházejí z jezer v Rusku, Finsku, Švédsku, Estonsku a Kazachstánu. Menší podíl na odlovu má také Německo, Polsko či Nizozemí (Policar a kol., 2014). Od 70. let minulého století ovšem produkce candáta lovem klesla zhruba na polovinu, což je způsobeno zejména dlouhodobým nadměrným odchytem, poškozením místních populací a také nesprávným rybářským managementem na daných lokalitách (Dil a Teletchea, 2008). To zapříčiňuje, že množství vylovených ryb, a tedy i dodávky na trh jsou v průběhu roku kvalitativně i kvantitativně velmi nestabilní (Steffens a kol., 1996). Z tohoto důvodu se candát stal předmětem intenzivního chovatelského zájmu a farmový chov candáta zaznamenal podstatný nárůst v posledním desetiletí (Steenfeldt, 2015). Pro komerční chovy je nutné zajistit optimální technologii umělé reprodukce za účelem získání kvalitních oplozených jiker a následné produkce tržních ryb (Žarski a kol., 2015).

### 1.2. Biologie candáta obecného

Candát obecný je piscivorní, noční či za soumraku aktivní druh ryby, který se vyskytuje zejména ve sladkých vodách a do jisté míry i v brakických vodách s nízkou salinitou. Je hojně rozšířen po celé Evropě a byl introdukovaný do dalších zemích, jako je například Turecko, Maroko a Tunisko (M'hetli a kol., 2011).

V dospělosti candát může dosahovat maximální velikosti až 1 m (Hanel a Lusk, 2005). Pohlavní dospělost většinou nastává mezi druhým a čtvrtým rokem života a obecně lze říci, že mlíčáci dosahují pohlavní zralosti o rok dříve než jikernačky (Raikova-Petrova a Živkov, 1998). Mimo reprodukční období je velmi obtížné určit pohlaví na základě morfologických znaků. V období tření již mají jikernačky zvětšenou a vypouklou dutinu břišní a ve srovnání s mlíčáky mají světlé zbarvení břicha, zatímco mlíčáci mají zbarvení tmavší (Obr. 1); (Dubský a kol., 2003). Samotné tření nastává ve střední Evropě v období od dubna do června, kdy teplota vody dosáhne prahu 8–16 °C (Ruuhijärvi a Hyvärinen, 1996). Ryby vyhledávají vhodné trdliště, jako např. písčité až štěrko-hlinité podloží nebo vegetací porostlá místa a kořeny vodních rostlin. Samec očistí trdliště od nánosů a po utvoření párů a po výtěru, jsou jikry hlídány samcem až

do vylíhnutí larev, které nastává po 100 až 110 d° (8–10 dní); (Schlumberger a Proteau, 1991). Candát obecný je poměrně plodná ryba s průměrnou relativní plodností 200 000 jiker.kg<sup>-1</sup>. Jikry obsahují olejovou kapénku, jsou lepkavé a ve srovnání s ostatními druhy ryb jsou celkem malé. Velikost jiker se pohybuje od 0,7–0,8 mm před nabobtnáním a 1,1–1,5 mm po nabobtnání (Lappalainen a kol., 2003). Larvy se líhnou o přibližné velikosti 4,5–5 mm a přecházejí na vnější výživu po 100 až 110 d° (Schlumberger a Proteau, 1991).



**Obr. 1.** Pohled na mlíčáka a jikernačku (Foto: J. Knowles).

---

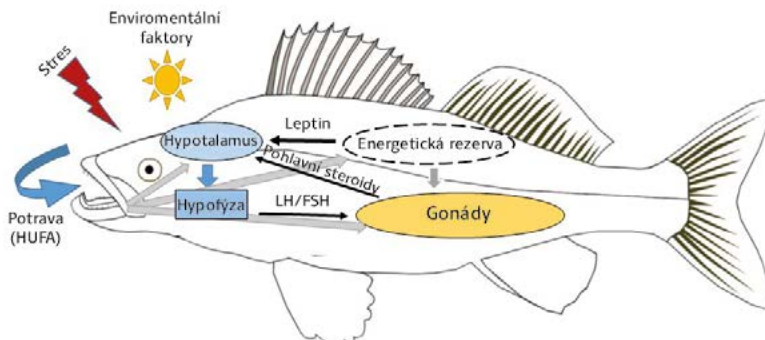
### 1.3. Neuroendokrinní řízení reprodukce

---

Neuroendokrinní řízení ovulace a spermiace se u candáta výrazně neliší od ostatních druhů studenomilných ryb a je především určováno environmentálním prostředím (Feiner a Höök, 2015). Signály, jako je například teplota či fotoperioda, stimulují produkci gonadotropin uvolňujícího hormonu (GnRH), který indukuje uvolnění luteinizačního hormonu (LH) a folikuly stimulujícího hormonu (FSH) z hypofýzy do krevního řečiště. Tyto hormony následně aktivují specifické receptory nacházející se v gonádách a regulují vývoj zárodečných buněk. Pohlavní steroidy formují následně zpětnou vazbu, která má negativní nebo pozitivní efekt na mozek a hypofýzu, která kontroluje exkreci LH a FSH (Žarski a kol., 2015).



# INDUKCE OVULACE POMOCI PŘÍPRAVKŮ NA BÁZI PLGA MIKROČÁSTIC S mGnRHa U CANDÁTA OBECNÉHO (*SANDER LUCIOPERCA*)



**Obr. 2.** Schématický přehled faktorů ovlivňující neuroendokrinní řízení reprodukce candáta obecného. Environmentální faktory a endogenní signály (např. leptin) aktivují sekreci GnRH z hypotalamu a indukují produkci LH a FSH z hypofýzy. Pohlavní steroidy následně představují zpětnou vazbu mozku. Stres a výživa, zejména vysoce nenasycené mastné kyseliny, ovlivňují aspekty endokrinní kontroly. Energetické rezervy jsou mobilizovány v průběhu zrání gonád (Cerdá a kol., 1995).

Vedle environmentálních vlivů působí na neuroendokrinní řízení reprodukce celá plejáda interních faktorů, jako například výživa, energetické rezervy, zdravotní stav. Výživa ovlivňuje kondici jednatelce nepřímo spouštěním endokrinní odpovědi, zatímco vysoce nenasycené mastné kyseliny (HUFA) přímo ovlivňují mozek a gonády (Cerdá a kol., 1995).

Mezi antropogenní faktory řadíme stres, který prostřednictvím hormonu ze skupiny glukokortikoidů – kortizolu negativně ovlivňuje reprodukci a může dokonce vyvolat její úplnou inhibici (Milla a kol., 2009). Endokrinní řízení reprodukce je schematicky znázorněno na Obr. 2.

---

## 1.4. Kvalita gamet

---

Pro spolehlivou a konstantní nabídku na trhu je esenciální produkce velkého množství ryb v kterémkoliv ročním období. Zajištění vysoké kvality a kvantity gamet je tudíž nezbytným předpokladem u všech druhů chovaných v intenzivní akvakultuře (Bobe a Labbé, 2010). U candáta je ovšem variabilita v kvalitě gamet velmi častým problémem a stále zůstává jednou z hlavních překážek v jeho produkci (Overton a kol., 2015).

U jiných běžně chovaných druhů byla variabilita kvality gamet připisována teplotním změnám, velikosti generačních ryb, druhu hormonální simulace, mimosezónnosti výtěrů, výživě či stresu z manipulace (Bobe a Labbé,

2010; Schaerlinger a Žarski, 2015; Valdebenito a kol., 2015). Manipulace s environmentálními faktory může mít za následek poruchy endokrinního systému, který reguluje reprodukci (Hermelink a kol., 2013). Je předpoklad, že takové narušení je přenášeno na gamety a vede k vývojovým změnám v průběhu rané ontogeneze. Nicméně je potřeba upřesnit, že existují pouze omezené znalosti o vlivu jednotlivých faktorů na kvalitu gamet u candáta obecného.

Vysoká kvalita jiker je obecně definována jako schopnost oplodnění, úspěšné zahájení embryologického vývoje a schopnost se vylíhnout (Bobe a Labbé, 2010). Ke splnění těchto podmínek je nutné, aby ovocyt obsahoval všechny nezbytné složky potřebné pro úspěšnou embryogenezi. Přebytek a deficit některých složek, např. specifických mastných kyselin, živin, mateřské mRNA, mohou výrazně ovlivnit, nebo dokonce blokovat samotnou embryogenezi (Schaerlinger a Žarski, 2015). Znalost vlivu jednotlivých faktorů může následně umožnit predikci vývojového potenciálu embrya z ještě neoplozeného vajíčka. Na druhé straně, vysoká kvalita spermií je také potřebná k úspěšnému oplodnění vajíčka. Sperma přispívá ke složení vajíčka velmi omezeně, ale zabezpečuje nezbytný genetický materiál. Jednou z metod stanovení kvality spermatu je analýza pohybu spermií, jako například rychlost pohybu, procento pohyblivých spermií a délka pohybu. Analýza kvality spermatu umožňuje následnou predikci úspěšnosti oplodnění (Rurangwa a kol., 2004).

---

### 1.5. Současné metody řízení reprodukce u candáta

---

V současné době jsou v intenzivních podmínkách nejčastěji používány dvě metody výtěru, a to je tzv. poloumělý výtěr (metoda výtěru v nádrži) a umělý výtěr (Wang a kol., 2009). V prvním případě je umístěn mlíčák a jikernačka bez hormonální anebo s hormonální stimulací do nádrže vybavené třecím hnízdem (Obr. 3). Třecí hnízda jsou zhotovena z různých materiálů a v současné době především z materiálů umělých (rohoží, kartáčů či travních koberců). V případě větší nádrže se může nasadit i více párů a počet hnízd by měl odpovídat počtu párů tak, aby došlo k eliminaci bojů o výtěrová hnízda (Wang a kol., 2009; Policar a kol., 2016). V současnosti se u poloumělého výtěru nejvíce využívá tzv. párového výtěru, kdy se do jedné nádrže s výtěrovým hnízdem umísťuje pouze jeden pár. Jikernačky je potřeba před nasazením do nádrže hormonálně stimulovat. Ke stimulaci jikernaček je možné použít vhodné přípravky i dávkování jako u stimulace k umělému výtěru (viz níže). Mlíčáky většinou není potřeba hormonálně stimulovat nicméně v případě, že mlíčáci nejsou připraveni k výtěru, měli by být stimulováni poloviční dávkou, která je podávána jikernačkám (Rónyai, 2007). Výhodou této metody je snížení nutnosti

## INDUKCE OVULACE POMOCI PŘÍPRAVKŮ NA BÁZI PLGA MIKROČÁSTIC S mGnRHa U CANDÁTA OBECNÉHO (*SANDER LUCIOPERCA*)

manipulace. Často ale dochází k ovulaci jiker mimo třecí hnízdo, případně jsou jikry kladeny v silné vrstvě, což podporuje rozvoj plísni např. *Saprolegnia* sp.

Druhým populárním způsobem výtěru je umělý výtěr. Základním prvkem této metody je využívání hormonální stimulace za účelem dosažení ovulace či spermiace. Ke stimulaci je možné použít široké spektrum účinných látek. K indukci ovulace je možné jednorázově použít kapří hypofýzu v dávce 3–4 mg.kg<sup>-1</sup> (Zakęs a Demska-Zakęs, 2005). Dalším úspěšným přípravkem ke stimulaci ovulace je lidský choriongonadotropin (hCG) v množství 500 IU.kg<sup>-1</sup> podaný v jedné dávce (Křiřtan a kol., 2013). S úspěchem byl také aplikován analog gonadotropin uvolňujícího hormonu (GnRHa), jehož dávkování se pohybuje mezi 20–50 µg.kg<sup>-1</sup>. Doba latence (čas od injekce do ovulace) se obvykle pohybuje v rozmezí od 10 do 70 hodin, v závislosti na druhu použitého preparátu a stadiu zralosti (Žarski a kol., 2012). Po výtěru do suchých a čistých misek jsou jikry uměle oplodněny spermatem. K oplodnění se běžně používá sperma odebírané do injekčních stříkaček od několika spontánně spermiujících mlíčáků (Blecha a kol., 2015). K oplodnění 100g jiker je doporučeno použít 1–2 ml spermatu a 20ml vody (Zakęs a Demska-Zakęs, 2005). Samotné sperma je poměrně husté, s koncentrací spermií v rozmezí 16–20 × 10<sup>9</sup>.ml<sup>-1</sup> s maximální dobou pohybu 95 s (Blecha a kol., 2015). Pohyblivost spermií se obvykle pohybuje od 50–90%, a proto se doporučuje používat mlíčí alespoň od 3 různých jedinců (Zakęs a Demska-Zakęs, 2005). Přibližně 3 minuty po aktivaci vodou se jikry stávají poměrně silně lepkavé. Před inkubací je lepkavost nutné odstranit. Odstranění lepkavosti je možné za použití mastku, proteázy, alkalázy či mléka. Po odstranění lepkavosti se jikry standardně inkubují v Zugských lahvích při teplotě 16–17 °C (Policar a kol., 2011).



**Obr. 3.** Výtěrové hnízdo pro candáta obecného (Foto: J. Knowles).

## 1.6. Řízené uvolňování GnRHa při reprodukci ryb pomocí implantátů

Kontrolované uvolňování GnRHa z implantátů představuje v současné době jednu z předních oblastí farmacie a biotechnologie. Oproti konvenčnímu injekčnímu podání má tato technologie značné výhody, jako je například jeho regulované uvolňování, nízká toxicita, lepší účinnost a jednoduchost podání (Lin a kol., 2014). Bylo prokázáno, že GnRHa se rozpadá do 30 minut v krevním řečišti (Gothilf a Zohar, 1991). Naproti tomu optimalizované uvolňování GnRHa z implantátů zvyšuje jeho koncentraci v krvi, která může trvat i několik týdnů. Plynulé uvolňování GnRHa účinně indukuje dlouhodobé uvolňování LH a stimuluje gonády efektivněji než jednorázově aplikovaný GnRHa (Mylonas a kol., 1995). Kontrolované postupné uvolňování GnRHa je výhodné zejména u ryb s asynchronním dozráváním jiker, jelikož dlouhotrvající stimulace sekrece LH z hypofýzy způsobuje dozrávání většího množství ovocytů s opakující se ovulací (Carrillo a kol., 2000).

V současné době je v akvakultuře využíváno několika druhů systémů pro kontrolované uvolňování GnRHa. Jako první byly již v roce 1983 použity cholesterolové pelety s implementovaným GnRHa a celulózou, která zpomalovala jeho uvolňování. Uvolňování samotného GnRHa z těchto pelet pak trvalo 28 dní (Weil a Crim, 1983). I přes některé nevýhody, jako je například variabilita v uvolňování GnRHa mezi jednotlivými peletami, našel tento systém široké komerční uplatnění. Jeho pozitivní vliv na maturaci byl potvrzen u druhů ryb, jako je například lates stříbřitý (*Lates calcarifer*), losos obecný (*Salmo salar*), robalo bělavé (*Centropomus viridis*) a vyza velká (*Huso huso*); (Almendras a kol., 1988; Anderson a kol., 2017; Aramli a kol., 2017; Ibarra-Castro a kol., 2017).

Další látkou používanou pro kontrolované uvolňování léčiv je nedegradovatelný kopolymer etylenu a vinylacetátu (EVAc; Obr. 4) vyrobený ve tvaru implantátu, který je aplikován intramuskulárně (Brown a kol., 1986). Rychlost uvolňování GnRHa z EVAc implantátu může být v rozmezí od 15 dní až po 5 týdnů v závislosti na jejich přípravě. Jejich nespornou výhodou oproti cholesterolovým peletám je jejich snadná výroba, kdy v jedné dávce je možné vyrobít až 500 implantátů, což výrazně snižuje variabilitu obsahu GnRHa (Zohar, 1996). EVAc systém našel popularitu zejména u indukce maturity mořských druhů ryb a jeho pozitivní efekt byl dokumentován u druhů, jako je například kranas Dumerilův (*Seriola dumerili*), mořčák evropský (*Dicentrarchus labrax*), tuňák obecný (*Thunnus thynnus*) a mnoho dalších (Forniés a kol., 2001; Jerez a kol., 2018; Rosenfeld a kol., 2012).

## INDUKCE OVULACE POMOCI PŘÍPRAVKŮ NA BÁZI PLGA MIKROČÁSTIC S mGnRHa U CANDÁTA OBECNÉHO (*SANDER LUCIOPERCA*)



**Obr. 4.** EVAc implantáty (Foto: J. Knowles).

---

### 1.7. PLGA mikročástice

---

Mikročástice jsou v současnosti velmi intenzivně studovány a považovány za perspektivní lékovou formu. Mikročástice je termín, který označuje částici kulovitého tvaru o průměru 1–1 000  $\mu\text{m}$  (Birnbbaum a Brannon-Peppas, 2004). Ve farmakologii mikročástice nahrazují léky první generace, které se řídí kinetikou prvního řádu, tzn., že po podání léku dosáhne léčivá látka svého maxima a poté klesá (Komárek a Rabišková, 2006). V takových případech je opakované podávání léčiva zapotřebí k udržení stálé terapeutické hladiny. Z tohoto důvodu je současný vývoj a výzkum zaměřen na vytvoření lékových forem, které zajistí kontrolované uvolňování léčiv o specifické dávce a po přesně definovaný časový úsek. Takové lékové formy pak zvyšují účinnost léčiva, eliminují výskyt nežádoucích účinků a celkové množství podaného léčiva je nižší (Vysloužil a kol., 2013).

Mikročástice v lékové formě mohou velmi účinně řídit uvolňování léčiva a efektivně ochraňují enkapsulovanou látku proti enzymatické degradaci (Birnbbaum a Brannon-Peppas, 2004). Dalšími výhodami mikročastic je lokální dodání léčiva, s délkou uvolňování od několika hodin po několik týdnů a jejich jednoduchá aplikace ve srovnání s běžně používanými implantáty (Siepmann a Siepmann, 2006). Další výhodou mikročastic je jejich násobný charakter, tzn., že jedna dávka je složená z většího množství jednotek, což způsobí rovnoměrné rozmístění léčiva v těle (Hickey a kol., 2002).

Široká škála přírodních i syntetických biologicky rozložitelných polymerů byla testována jako matrice mikročastic. Mezi nimi kopolymer kyseliny glykolové a mléčné (PLGA) našel nejširší uplatnění díky jeho extrémně dobré tkáňové biokompatibilitě, biodegradabilitě a vysoké flexibilitě při enkapsulaci léčiva (Hoffman, 2008). PLGA mikročastice jsou obvykle formovány tzv. metodou odpaření rozpouštědla. Velmi často je používána dvojitá emulze, kdy léčivo, které má být enkapsulováno, je primárně rozpuštěno ve vodě. Tato vodná fáze je rozptýlena v organickém rozpouštědle (dichlormetan), s obsahem degradabilního polymeru za vzniku první voda/olej emulze. Rozptýlení první emulze ve vodném médiu, poté formuje finální voda/olej/voda dvojitou emulzi. V průběhu odpařování se z rozpuštěného polymeru formuje pevná matrice, která do své struktury uzavírá léčivo (Ruan a Feng, 2003).

## 2. CÍL

Cílem této technologie je poskytnout rybářské praxi návod ke zvýšení a synchronizaci ovulace u candáta obecného za použití PLGA mikročastic jako nosičů syntetického analogu savčího gonadotropin uvolňujícího hormon (mGnRH<sub>a</sub>).

## 3. MÍSTO OVĚŘENÍ TECHNOLOGIE

Předložená technologie popisuje postup, který byl ověřován na Experimentálním rybochovném pracovišti a pokusnictví a v Laboratoři řízené reprodukce a intenzivního chovu ryb Fakulty rybářství a ochrany vod, Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích (FROV JU).

## 4. POPIS TECHNOLOGIE A VÝSLEDKY

Před ověřením této technologie byla provedena předběžná testovací studie, která sloužila jako podklad pro popsanou technologii. Tato studie byla zaměřena na zjištění vlivu PLGA mikročastic na ovulaci candáta a determinaci optimálních dávek mGnRH<sub>a</sub> v mikročasticích pro vytvoření budoucí technologie. Z výsledků testovací studie vyplynulo, že nižší dávky (<30  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) mGnRH<sub>a</sub> v mikročasticích jsou mnohonásobně účinnější, a je tak dosahováno vyšší ovulace než u dávek vysokých (>50  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). Testovací studii bylo nutné doplnit o co nej přesnější zachycení průběhu ovulace, hormonální odpověď organismu a líhnivost.

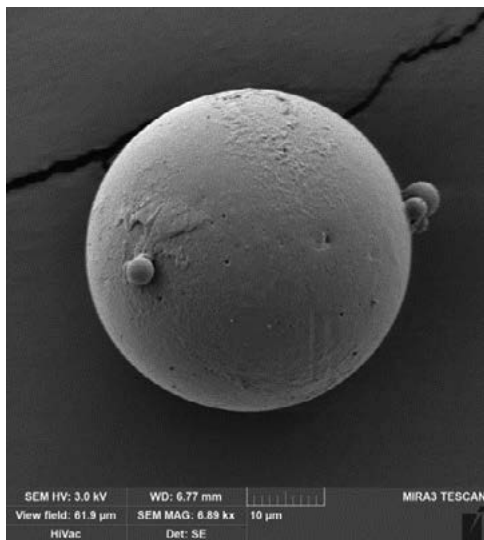
# INDUKCE OVULACE POMOCI PŘÍPRAVKŮ NA BÁZI PLGA MIKROČÁSTIC S mGnRHa U CANDÁTA OBECNÉHO (*SANDER LUCIOPERCA*)

## 4.1. Materiál a metodický postup

### 4.1.1. Příprava PLGA mikročastic

PLGA mikročastice byly připravovány ve spolupráci s Veterinární a farmaceutickou univerzitou Brno metodou založenou na standardním principu voda/olej/voda. Bylo rozpuštěno 10 mg alarelinu acetátu v 1,5 g 9,1% roztoku želatiny zahřátém na 50 °C (vodná fáze 1). Dále bylo rozpuštěno 800 mg amorfního polymeru na bázi PLGA v 5 ml dichlormetanu (olejová fáze). Takto připravené fáze byly mixovány ve vortexu po dobu 30 s a následně byly homogenizovány. Výsledná emulze voda/olej byla poté smíchána na homogenizátoru (60 s) s 12 g 1% roztoku polyvinylalkoholu zahřátém na 50 °C (vodná fáze 2) za účelem vytvoření koncentrované dvojité emulze voda/olej/voda.

Koncentrovaná emulze byla následně smíchána s 200 g 0,1% polyvinylalkoholu. Výsledná emulze voda/olej/voda byla míchána 2 hodiny, aby došlo k úplnému odpaření dichlormetanu. Vytvořené částice byly poté zkoncentrovány centrifugací, resuspendovány v destilované vodě a lyofilizovány. Hotové mikročastice byly uchovány v mrazicím boxu (-25 °C) až do doby jejich aplikace. Vytvořená PLGA mikročastice je znázorněna na Obr. 5.



**Obr. 5.** Pohled na PLGA mikročastice v rastrovacím elektronovém mikroskopu (Foto: J. Vysloužil).

#### 4.1.2. Generační ryby

Generační ryby byly sloveny v první polovině března 2019 na rybníku patřícím FROV JU. Ryby byly umístěny do sádek a krmeny střevličkou východní (*Pseudorasbora parva*) *ad libitum*. Před zahájením testování bylo u všech jikernaček stanoveno stadium připravenosti k výtěru.

Ovocyty byly od anestetizovaných jikernaček (hřebíčkový olej 0,04 ml.l<sup>-1</sup> po dobu 5 min.) odebírány pomocí speciálního katetru. Katetr se stříkačkou k vyvolání podtlaku byl zaveden asi 2–3 cm do urogenitální papily. Vzniklým podtlakem bylo odebráno přibližně 12–15 ovocytů (Obr 6.). Odebrané ovocyty byly následně umístěny do Sérova prosvětlovacího roztoku (96% ethanol, 36–38% formaldehyd a 99,5% kyselina octová ledová v poměru 6 : 3 : 1) a poté bylo pod binolupou určeno stadium připravenosti k ovulaci (zralost) pro každou jikernačku. Stadia zralosti byla determinována dle metodiky (Žarski a kol., 2012). Dle uvedené metody byly u jikernaček klasifikovány ovocyty do následujících stadií: 1. stadium – jádro ve středu ovocytu, nepozorovatelné tukové kapénky, 2. stadium – jádro migruje mimo střed ovocytu, s pozorovatelnými tukovými kapénkami, 3. stadium – jádro se zvětšuje, s dobře viditelnými tukovými kapénkami.



**Obr. 6.** Odběr ovocytů z urogenitální papily jikernačky candáta obecného (Foto: J. Knowles).



# INDUKCE OVULACE POMOCI PŘÍPRAVKŮ NA BÁZI PLGA MIKROČÁSTIC S mGnRHa U CANDÁTA OBECNÉHO (*SANDER LUCIOPERCA*)

Poté byly ryby náhodně rozděleny do 4 skupin, přičemž každá skupina čítala 10 ryb. Do skupiny byly vždy zahrnuty 3 jikernačky v 1. stadiu, 6 jikernaček ve 2. stadiu a 1 jikernačka ve 3. stadiu zralosti. Následně celá skupina byla nasazena do jedné nádrže o objemu 1 m<sup>3</sup> umístěné na průtočném systému a rybám bylo ponecháno 24 hodin na aklimatizaci.

## 4.1.3. Injikace generačních ryb

Po aklimatizaci byly jikernačky opět anestetizovány s následným odběrem krve z ocasního násadce. Po odběru byly ryby injikovány intraperitoneálně do hřbetní svaloviny preparáty dle níže uvedeného schématu (Tab. 1).

**Tab. 1.** Přehled skupin a použitých preparátů.

Preparát	Počet ryb	Prům. hmotnost (g)	Dávka
0,9% NaCl	10	1 163 ± 239	1 ml.kg <sup>-1</sup>
mGnRHa	10	1 137 ± 339	20 µg.kg <sup>-1</sup>
PLGA 5	10	889 ± 268	5 µg.kg <sup>-1</sup>
PLGA 20	10	1 133 ± 303	20 µg kg <sup>-1</sup>

První skupina byla injikována lidským fyziologickým roztokem (0,9% NaCl) a druhá skupina byla stimulována komerčně dostupným preparátem založeným na bázi mGnRHa, přičemž obě látky byly rybám aplikovány bez jakékoliv předešlé úpravy. PLGA mikročástice, které byly aplikovány zbylým dvěma skupinám, bylo potřeba připravit těsně před samotnou aplikací. Přesně odvážené množství mikročástic bylo smícháno s 0,9% roztokem NaCl a důkladně promícháno na vortexu. Výsledná suspenze byla okamžitě injikována jikernačkám za použití jehly průměru 1,2 mm. Větší průměr jehly měl zamezit případné sedimentaci PLGA mikročástic v hrdle jehly. Injekční aplikace PLGA mikročástic je znázorněna na Obr. 7.



**Obr. 7.** Intraperitoneální injekce suspenze PLGA mikročástic (Foto: J. Knowles).

Nežádoucí únik ovulovaných jiker z jikernaček byl zabezpečen zašitím močopohlavní papily za pomoci šetrného chirurgického stehu (Obr. 8). K zašití byla použita chirurgická nit vyrobená z vicrylu vybavená půlkulatou jehlou.

Po injekci a zašití močopohlavní papily byly ryby navráceny zpět do stejné nádrže. Teplota vody v nádrži byla měřena každou hodinu pomocí teplotního automatického záznamníku dat, nasycení kyslíkem a pH bylo vyhodnocováno dvakrát denně (6.30 a 14.00) pomocí kombinovaného oxymetru. Po celou dobu testování, včetně aklimatizace se hodnoty pohybovaly na těchto úrovních: pH  $7,2 \pm 0,2$ , nasycení kyslíkem  $80,4 \pm 3,1$  %, průtok  $8-10 \text{ l.min}^{-1}$ , teplota  $15,1 \pm 0,96$  °C, fotoperioda 14L:10D.

# INDUKCE OVULACE POMOCI PŘÍPRAVKŮ NA BÁZI PLGA MIKROČÁSTIC S mGnRHa U CANDÁTA OBECNÉHO (*SANDER LUCIOPERCA*)



**Obr. 8.** Zašití močopohlavní papily u jikernaček candáta (Foto: O. Malinovskyi).

## 4.1.4. Umělý výtěr

Po injekci byly ryby ponechány v klidu v nádrži po dobu 2 dnů. Následně byly ryby kontrolovány vždy každou hodinu, bez anestezie, jemnou masáží dutiny břišní. Ovulující jikernačky byly okamžitě přemístěny do předem připravené nádoby s anestetikem. Po vyjmutí z anestetika byly ryby osušeny a bylo odstraněno zašití močopohlavní papily. Jikernačky byly poté uměle vytřeny, každá do své předem připravené čisté a suché misky. Získané jikry byly zváženy s přesností 0,01 g pro následnou determinaci absolutní a relativní plodnosti. Z neoplozených jiker byl odebrán vzorek o hmotnosti 1 g, byly spočítány jikry a byla vypočtena plodnost jednotlivých jikernaček.

Dále následovala fáze oplození spermatem odebraným do injekčních stříkaček. Sperma bylo odebráno od mlíčáků, kteří jej spontánně uvolňovali, viz Obr. 9. Jikry od každé jikernačky byly oplodněny spermatem získaným alespoň od třech mlíčáků. Na 100 g jiker byly použity 2 ml odebraného spermatu. Vzorky oplozených jiker byly inkubovány v malých oddělených inkubátorech, a to u každé jikernačky vždy ve třech opakováních. Každý vzorek obsahoval 100 kusů jiker. Inkubátory byly umístěny na recirkulačním systému s teplotou vody  $16 \pm 0,5$  °C. Larvy se začaly líhnout pátý den po umělém výtěru a všechny čerstvě vylíhnuté larvy byly spočítány. Líhivost se počítala dle následujícího vzorce:

$$\text{Líhivost} = (\text{PL}/\text{PJ}) * 100$$

Kde PL je počet vylíhnutých larev a PJ je počet jiker na počátku inkubace.



**Obr. 9.** Odběr spermatu u mlička *candáta* obecného (Foto: J. Knowles).

#### 4.1.5. Odběr a analýza krevních vzorků

---

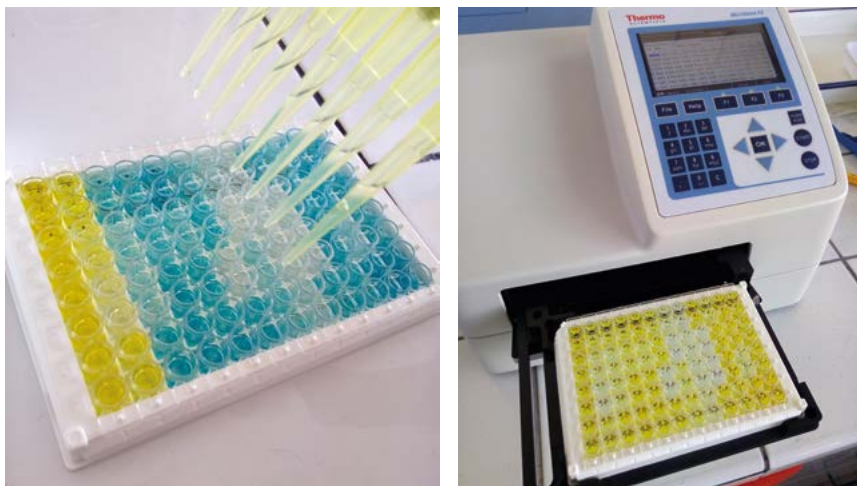
Každé jikernačce byla odebírána krev na analýzu pohlavních steroidů. Byly odebírány 2 ml krve předem heparinizovanou injekční stříkačkou punkcí ocasní cévy. Krev byla odebírána při samotném zahájení testování a následně po 48 a 96 hodinách po hormonální stimulaci. Odebraná krev byla okamžitě centrifugována (5 000 rpm, 10 min, 10 °C). Oddělená krevní plazma byla přesunuta do popsaných mini-zkumavek a uchována v mrazicím boxu při teplotě -20 °C až do doby její analýzy. Odběr krevních vzorků a vzorek po odstředění je znázorněn na Obr. 10.

## INDUKCE OVULACE POMOCI PŘÍPRAVKŮ NA BÁZI PLGA MIKROČÁSTIC S mGnRHa U CANDÁTA OBECNÉHO (*SANDER LUCIOPERCA*)



**Obr. 10.** Odběr krve z ocasního násadce a oddělená krevní plazma (Foto: J. Knowles).

Z pohlavních steroidů byly analyzovány testosteron (T), 11-keto testosteron (11-KT), 17 $\beta$ -estradiol (E2). Koncentrace pohlavních steroidů byla měřena vždy ve dvou opakováních pro daný vzorek. Samotná imunochemická analýza probíhala v Laboratoři řízené reprodukce a intenzivního chovu ryb a jednotlivé steroidy byly stanoveny na speciálních ELISA kitech určených pro analýzu pohlavních steroidů. Analýzy probíhaly přesně podle instrukcí výrobce jednotlivých kitů. V případě potřeby byly jednotlivé vzorky naředěny v poměru 1 : 2 nebo 1 : 20. Analýza vzorků je zaznamenána na Obr. 11.



**Obr. 11.** Analýza pohlavních steroidů pomocí imunochemické metody ELISA (Foto: J. Knowles).

#### 4.1.6. Statistické vyhodnocení

---

Všechna získaná data byla statisticky analyzována. Normalita a homogenita dat byla ověřena (Cochran C., Hartley, Bartlett) a všechny ukazatele byly analyzovány dvoufaktoriální analýzou variance (Tukey, HSD nebo Kruskal-Wallis test;  $P < 0,05$ ). Veškerá data jsou prezentována jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka.

### 4.2. Výsledky

---

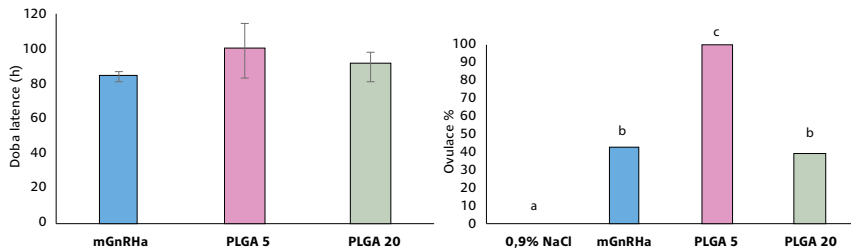
#### 4.2.1. Ovulace a doba latence

---

V průběhu experimentu bylo celkem vytřeno 18 ovulujících jikernaček. Nejvyšší ovulace bylo překvapivě dosaženo ve skupině injikované nižší dávkou PLGA mikročástic ( $5 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ). V této skupině ovulovaly všechny stimulované jikernačky bez ohledu na to, v jakém stadiu zralosti se na počátku experimentu nacházely. U kontrolní skupiny nedosáhla ovulace žádná ze samic a u zbylých dvou skupin ovulovalo pouze 40 % injikovaných jikernaček. U ryb injikovaných čistým mGnRH $\alpha$  a vyšší dávkou PLGA mikročástic ( $20 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ) dosáhly ovulace pouze jikernačky, které na počátku experimentu měly ovocyty ve 3. a 2. stadiu zralosti. Dosažené výsledky tedy ukazují, že nižší dávka mGnRH $\alpha$ , která se v těle jikernačky uvolňuje po delší časový interval, je mnohonásobně účinnější než konvenčně podávané vyšší dávky, které jsou běžně používány k indukci ovulace u candáta obecného.

Doba latence se u všech skupin pohybovala v rozmezí od 80 do 116 hodin a mezi jednotlivými skupinami nebyl zaznamenán žádný signifikantní rozdíl. U skupiny injikované nižší dávkou PLGA mikročástic ( $5 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ) se doba latence pohybovala mezi 86 a 116 hodinami, přičemž nejdříve dosáhly ovulace jikernačky, které měly na začátku testování ovocyty ve 3. stadiu a nejpozději ovulovaly ryby v 1. stadiu zralosti. Nízké časové rozmezí v době latence mezi jednotlivými skupinami velmi usnadnilo práci a organizaci na líhni v průběhu výtěru generačních ryb. Díky synchronizaci ovulace došlo k eliminaci spontánního výtěru v nádrži a také došlo ke snížení nutnosti manipulace s generačními rybami. Synchronizovaný výtěr je důležitý k zajištění stejného stáří oplodněných jiker, což je pro další organizaci na líhni důležitým faktorem. Dosažená ovulace a doba latence je graficky znázorněna na Obr. 12.

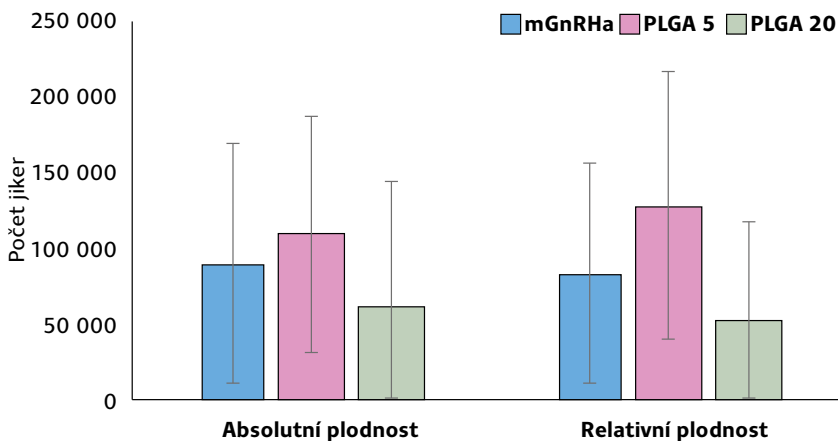
## INDUKCE OVULACE POMOCI PŘÍPRAVKŮ NA BÁZI PLGA MIKROČÁSTIC S mGnRH<sub>a</sub> U CANDÁTA OBEČNÉHO (*SANDER LUCIOPERCA*)



**Obr. 12.** Graficky znázorněná dosažená ovulace a doba latence u candáta obecného. Data jsou prezentována jako průměr (sloupec) a směrodatná odchylka (chybová úsečka). Rozdílné indexy nad sloupčky značí signifikantní rozdíl ( $P < 0,05$ ).

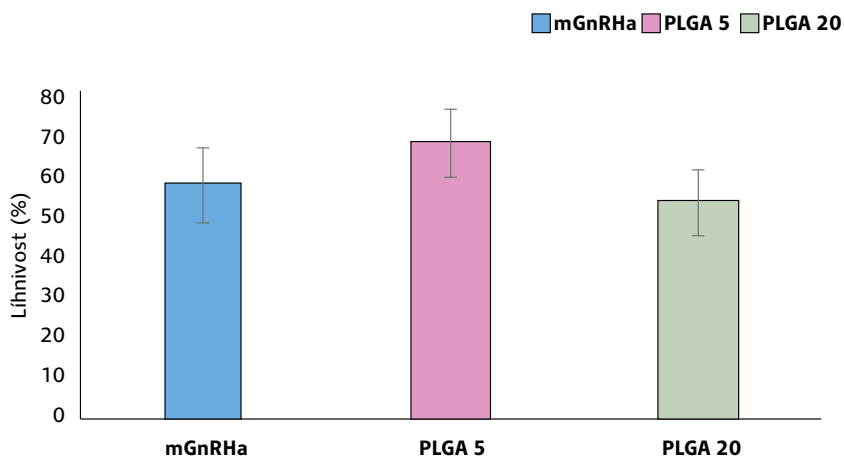
### 4.2.2. Plodnost a líhivost

Žádné signifikantní rozdíly mezi jednotlivými skupinami nebyly zaznamenány také ve spojení s relativní a absolutní plodností. Nicméně je nutné zmínit, že bylo zaznamenáno poměrně vysoké rozpětí v počtu získaných jiker mezi jednotlivými jikernačkami. Při umělých výtěrech byla průměrná absolutní plodnost  $94\,518 \pm 84\,412$  a relativní plodnost  $101\,597 \pm 88\,216$  jiker. Rozdíly v množství získaných jiker lze pravděpodobně přičíst časté manipulaci a stresu za účelem zachytit, co nejpřesnější průběh ovulace. Relativní a absolutní plodnost je graficky zachycena na Obr. 13.



**Obr. 13.** Graficky znázorněná absolutní a relativní plodnost u candáta. Data jsou prezentována jako průměr (sloupec) a směrodatná odchylka (chybová úsečka).

Průměrná líhivost byla v rámci všech skupin  $62,3 \pm 11,5\%$ . Nejvyšší líhivost byla zaznamenána u skupiny PLGA 5, a to  $67 \pm 11,6\%$ , a nejnižší u skupiny PLGA 20, kde se pohybovala na úrovni  $53,4 \pm 9,4\%$ . Mezi jednotlivými skupinami nebyl nalezen statisticky významný rozdíl. Graficky zaznamenaná líhivost je na Obr. 14. V průběhu líhnutí a prvních 10 dnech po vylíhnutí nebyly u larev pozorovány žádné viditelné morfologické a fyziologické abnormality.



**Obr. 14.** Líhivost larev *Candacia* v průběhu experimentu. Data jsou prezentována jako průměr (sloupec) a směrodatná odchylka (chybová úsečka).

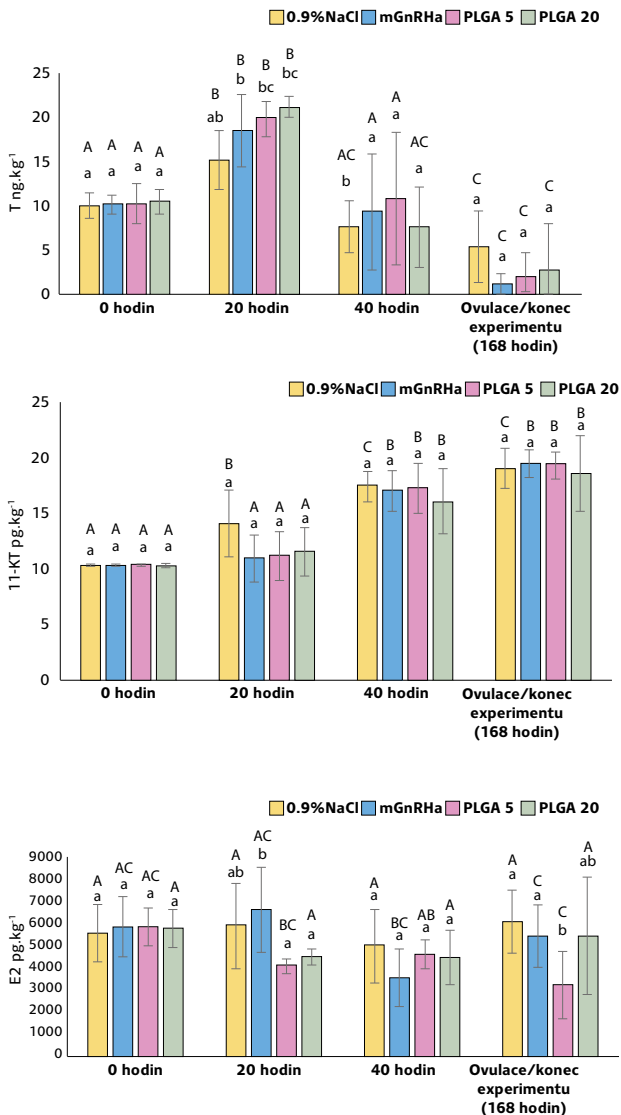
#### 4.2.3. Hormonální odpověď organismu

Analýza pohlavních steroidů ukázala, že úroveň testosteronu (T) v krevní plazmě vzrostla u všech skupin do 20 hodin po aplikaci jednotlivých preparátů, aby posléze výrazně klesla v době ovulace. 11-keta testosteron (11-KT) vykazoval vzrůstající tendenci u všech skupin bez ohledu na druh hormonální injekce, a to i v případě kontroly. Stoupající hladiny T a 11-KT u kontrolní skupiny si vysvětlujeme nasazením ryb ze sádek do nádrží, kde došlo k mírnému zvýšení teploty vody pozitivně stimuluji steroidogenezi.

Hladina E2 vykazovala mezi 20. až 168. hodinou poměrně nekonzistentní hodnoty. Koncentrace E2 u skupiny mGnRHα byla po hormonální injekci signifikantně vyšší oproti skupinám injikovaným PLGA mikročásticemi, zatímco obě PLGA skupiny vykazovaly snižující se úrovně E2. Hladiny pohlavních steroidů jsou zaznamenány na Obr. 15.



# INDUKCE OVULACE POMOCI PŘÍPRAVKŮ NA BÁZI PLGA MIKROČÁSTIC S mGnRHa U CANDÁTA OBEČNÉHO (*SANDER LUCIOPERCA*)



**Obr. 15.** Hladiny pohlavních steroidů v krevní plazmě jikernaček candáta obecného. Data jsou prezentována jako průměr (sloupec) a směrodatná odchylka (chybová úsečka). Signifikantní rozdíly mezi skupinami v době odběru vzorků jsou označeny malými indexy a signifikantní rozdíly ve skupině během experimentálního období jsou značeny velkými indexy ( $P < 0,05$ ).

## 5. EKONOMICKÝ PŘÍNOS

Ekonomické přínosy předložené technologie založené na optimalizaci umělého výtěru candáta obecného jsou primárně představovány dosažením signifikantně vyššího počtu ovulujících jikernaček nežli po standardním ošetření. Dochází k snížení celkové dávky účinného GnRH<sub>a</sub> a celkového zlepšení welfare generačních ryb.

Vyjmenovaná fakta získávají na významu v kontextu plánovaného zavádění domestikovaných linií candáta obecného do akvakulturních chovů s vizí kompletního uzavření produkčního cyklu a následné selekce vhodných vlastností, jako např. rychlejší tempo růstu, vyšší odolnost vůči stresu atd. Je proto vysoce žádoucí optimalizovat jednotlivé kroky umělé reprodukce málo početného a o to více ceněného domestikovaného generačního materiálu. Využití námi uvedeného technologického postupu vede k významně vyšší úspěšnosti umělého výtěru s následným získáním jiker v optimální kvalitě. Námi předpokládané ekonomické zhodnocení této technologie se pohybuje v miliónech českých korun představované zvýšenou rentabilitou optimalizované reprodukce a následné produkce domestikovaných candátů obecných ve stávajících a plánovaných RAS objektech.

## 6. UPLATNĚNÍ TECHNOLOGIE V PRAXI

Tato technologie představuje zcela inovativní metodu použití PLGA mikročástic jako nosiče hormonální substance k indukci maturace u candáta obecného. Nejen v České republice, ale pravděpodobně i ve světě se jedná o první ověření této nové technologie k indukci ovulace ryb. Tato technologie byla při svém ověřování velmi úspěšná a dává managementu líhně možnost velmi jednoduchého budoucího uplatnění a možnost mnohem efektivějšího plánování prací na líhních v období výtěrové sezóny.

Do budoucna plánujeme vyřešení problému velkého rozpětí množství získaných jiker, které se zdá být spíše problémem metodiky vlastních vědeckých pokusů než hormonální zásahu ve snaze zachytit co nejpřesněji průběh ovulace po hormonální stimulaci. Další experimenty by tento problém měly zcela eliminovat. Obecně lze tedy konstatovat, že prezentovaná technologie představuje pro rybářskou praxi slibnou inovativní metodu hormonální stimulace, která může relativně jednoduchým způsobem zajištění stabilní a kvalitní produkce candáta obecného.

# INDUKCE OVULACE POMOCI PŘÍPRAVKŮ NA BÁZI PLGA MIKROČÁSTIC S mGnRH $\alpha$ U CANDÁTA OBECNÉHO (*SANDER LUCIOPERCA*)

## 7. SEZNAM LITERATURY

- Almendras, J.M., Duenas, C., Nacario, J., Sherwood, N.M., Crim, L.W., 1988. Sustained hormone release. III. Use of gonadotropin releasing hormone analogues to induce multiple spawnings in sea bass, *Lates calcarifer*. *Aquaculture* 74: 97–111.
- Anderson, K., Pankhurst, N., King, H., Elizur, A., 2017. Effects of GnRH $\alpha$  treatment during vitellogenesis on the reproductive physiology of thermally challenged female Atlantic salmon (*Salmo salar*). *The Journal of Life and Environmental Sciences* 5: e3898.
- Aramli, M.S., Nazari, R.M., Farsi, P., Mehdinejad, N., Aramli, S., Sotoudeh, E., 2017. Retracted: Effectiveness of carp pituitary extract and luteinizing hormone releasing hormone analogue administration (by either injection or cholesterol pellet implantation) on spawning performance in female sturgeon, *Huso huso*. *Aquaculture Research* 48: 1915–1922.
- Birnbaum, D.T., Brannon-Peppas, L., 2004. Microparticle drug delivery systems, Drug delivery systems in cancer therapy. Springer, pp. 117–135.
- Blecha, M., Kristan, J., Samarin, A.M., Rodina, M., Policar, T., 2015. Quality and quantity of pikeperch (*Sander lucioperca*) spermatozoa after varying cold water treatments. *Journal of Applied Ichthyology* 31: 75–78.
- Bobe, J., Labbé, C., 2010. Egg and sperm quality in fish. *General and Comparative Endocrinology* 165: 535–548.
- 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.
- Carrillo, M., Mañanós, E., Sorbera, L., Milonas, C., Cuisser, B., Zohar, J., Zanuy, S., 2000. Effects of sustained administration of GnRH $\alpha$  on gonadotropin-II (GtH-II) and gonadal steroid levels in adult male sea bass (*Dicentrarchus labrax*), *International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish*.
- Cerdá, J., Zanuy, S., Carrillo, M., Ramos, J., Serrano, R., 1995. Short-and long-term dietary effects on female sea bass (*Dicentrarchus labrax*): seasonal changes in plasma profiles of lipids and sex steroids in relation to reproduction. *Comparative Biochemistry and Physiology* 111: 83–91.
- Dil, H., Teletchea, F., 2008. The European market of the pikeperch for consumption. In: Fontaine, P., Kestemont, P., Wang, N. (Eds), *Percid fish culture, from research to production*. Presses Universitaires de Namur, Namur, Belgium, pp. 15–16.
- Dubský, K., Šrámek, V., Kouřil, J., 2003. *Obecné rybářství*. Informatorium, Praha, 194 s.
- Feiner, Z.S., Höök, T.O., 2015. Environmental biology of percid fishes. In: Kestemont, P., Dabrowski, K., Summerfelt, R.C. (Eds), *Biology and Culture of Percid Fishes*. Springer, pp. 61–100.
- Forniés, M., Mañanós, E., Carrillo, M., Rocha, A., Laureau, S., Mylonas, C., Zohar, Y., Zanuy, S., 2001. Spawning induction of individual European sea bass females (*Dicentrarchus labrax*) using different GnRH $\alpha$ -delivery systems. *Aquaculture* 202: 221–234.
- Gothilf, 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*, pp. 35–37.
- Hanel, L., Lusk, S., 2005. *Ryby a mihule České republiky: rošření a ochrana*. Český svaz ochránců přírody Vlašim.
- Hermelink, B., Wuertz, S., Rennert, B., Kloas, W., Schulz, C., 2013. Temperature control of pikeperch (*Sander lucioperca*) maturation in recirculating aquaculture systems—induction of puberty and course of gametogenesis. *Aquaculture* 400: 36–45.

- Hickey, T., Kreutzer, D., Burgess, D., Moussy, F., 2002. Dexamethasone/PLGA microspheres for continuous delivery of an anti-inflammatory drug for implantable medical devices. *Biomaterials* 23: 1649–1656.
- Hoffman, A.S., 2008. The origins and evolution of “controlled” drug delivery systems. *Journal of Controlled Release* 132: 153–163.
- Ibarra-Castro, L., Navarro-Flores, J., Sánchez-Télez, J.L., Martínez-Brown, J.M., Ochoa-Bojórquez, L.A., Rojo-Cebreros, Á.H., 2017. Hatchery Production of Pacific White Snook at CIAD-Unity Mazatlan, Mexico. *World Aquaculture*: 25.
- Jerez, S., Fakiadis, I., Papadaki, M., Martín, M., Cejas, J.R., Mylonas, C.C., 2018. Spawning induction of first-generation (F1) greater amberjack *Seriola dumerili* in the Canary Islands, Spain using GnRH delivery systems. *Fishes* 3: 35.
- Komárek, P., Rabišková, M., 2006. *Technologie léků (3., přepracované a doplněné vydání)*. Galén, Praha 5, s. 174–179.
- 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.
- Lappalainen, J., Dörner, H., Wysujack, K., 2003. Reproduction biology of pikeperch (*Sander lucioperca* (L.)) – a review. *Ecology of Freshwater Fish* 12: 95–106.
- Lin, Z., Gao, W., Hu, H., Ma, K., He, B., Dai, W., Wang, X., Wang, J., Zhang, X., Zhang, Q., 2014. Novel thermo-sensitive hydrogel system with paclitaxel nanocrystals: High drug-loading, sustained drug release and extended local retention guaranteeing better efficacy and lower toxicity. *Journal of Controlled Release* 174: 161–170.
- M'hetli, M., Ben Khemis, I., Hamza, N., Turki, B., Turki, O., 2011. Allometric growth and reproductive biology traits of pikeperch *Sander lucioperca* at the southern edge of its range. *Journal of Fish Biology* 78: 567–579.
- Milla, S., Wang, N., Mandiki, S., Kestemont, P., 2009. Corticosteroids: friends or foes of teleost fish reproduction? *Comparative Biochemistry and Physiology* 153: 242–251.
- 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.
- Overton, J.L., Toner, D., Policar, T., Kucharczyk, D., 2015. Commercial production: factors for success and limitations in European percid fish culture. In: Kestemont, P., Dabrowski, K., Summerfelt, R.C. (Eds), *Biology and Culture of Percid Fishes*. Springer, pp. 881–890.
- Policar, T., Blecha, M., Křišťan, J., 2016. Hromadný poloumělý výtěr candáta obecného (*Sander lucioperca* L.) v recirkulačním akvakulturním systému. *Edice Metodik, FROV JU, Vodňany*, č. 163, 24 s.
- Policar, T., Bláha, M., Křišťan, J., Stejskal, V., 2011. Kvalitní a vyrovnaná produkce rychleného plůdku candáta obecného (*Sander lucioperca*) v rybnících. *Edice Metodik, FROV JU, Vodňany*, č. 110, 33 s.
- Policar, T., Křišťan, J., Blecha, M., Vaniš, J., 2014. Adaptace a chov juvenilních ryb candáta obecného (*Sander lucioperca* L.) v recirkulačním akvakulturním systému (RAS). *Edice Metodik, FROV JU, Vodňany*, č. 141, 46 s.
- Raikova-Petrova, G., Živkov, M., 1998. Maturity, spawning and sex ratio of pike perch, *Stizostedion lucioperca* (L.), in two Bulgarian reservoirs as compared to other European habitats. *Journal of Applied Ichthyology* 14: 31–35.
- Rónyai, A., 2007. Induced out-of-season and seasonal tank spawning and stripping of pike perch (*Sander lucioperca* L.). *Aquaculture Research* 38: 1144–1151.

## INDUKCE OVULACE POMOCI PŘÍPRAVKŮ NA BÁZI PLGA MIKROČÁSTIC S mGnRH $\alpha$ U CANDÁTA OBECNÉHO (*SANDER LUCIOPERCA*)

- Rosenfeld, H., Mylonas, C., Bridges, C., Heinisch, G., Corriero, A., Vassallo-Aguis, R., Medina, A., Belmonte, A., Garcia, A., De la Gándara, F., 2012. GnRH $\alpha$ -mediated stimulation of the reproductive endocrine axis in captive Atlantic bluefin tuna, *Thunnus thynnus*. *General and Comparative Endocrinology* 175: 55–64.
- 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.
- Rurangwa, E., Kime, D., Ollevier, F., Nash, J., 2004. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture* 234: 1–28.
- Ruuhijärvi, J., Hyvärinen, P., 1996. The status of pike-perch culture in Finland. *Journal of Applied Ichthyology* 12: 185–188.
- Schaerlinger, B., Źarski, D., 2015. Evaluation and improvements of egg and larval quality in percid fishes. In: Kestemont, P., Dabrowski, K., Summerfelt, R.C. (Eds), *Biology and Culture of Percid Fishes*. Springer, pp. 193–223.
- Schlumberger, O., Proteau, J., 1991. Production de Juvéniles de sandre (*Stizostedion lucioperca*). *Aqua Revue* 36: 25–28.
- Siepmann, J., Siepmann, F., 2006. Microparticles used as drug delivery systems, *Smart Colloidal Materials*. Springer, pp. 15–21.
- Steenfeldt, S., 2015. Culture methods of pikeperch early life stages. In: Kestemont, P., Dabrowski, K., Summerfelt, R.C. (Eds), *Biology and Culture of Percid Fishes*. Springer, pp. 295–312.
- Steffens, W., Geldhauser, F., Gerstner, P., Hilge, V., 1996. German experiences in the propagation and rearing of fingerling pikeperch (*Stizostedion lucioperca*), *Annales Zoologici Fennici*. JSTOR, pp. 627–634.
- Valdebenito, I.I., Gallegos, P.C., Effer, B.R., 2015. Gamete quality in fish: evaluation parameters and determining factors. *Zygote* 23: 177–197.
- Vysloužil, J., Dvořáčková, K., Kejdušová, M., Rabišková, M., 2013. Příprava léčivých mikročastic metodou odpařování rozpouštědla. *Chemické Listy* 107: 16–23.
- Wang, N., Mandiki, S., Henrotte, E., Bouyahia, A.G., Mairesse, G., Rougeot, C., Melard, C., Kestemont, P., 2009. Effect of partial or total replacement of forage fish by a dry diet on the quality of reproduction in pikeperch, *Sander lucioperca*. *Aquaculture Research* 40: 376–383.
- 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.
- Zakeš, Z., Demska-Zakeš, K., 2005. Artificial spawning of pikeperch (*Sander lucioperca* (L.)) stimulated with human chorionic gonadotropin (hCG) and mammalian GnRH analogue with a dopamine inhibitor. *Fisheries & Aquatic Life* 13: 63–75.
- Źarski, D., Horváth, A., Held, J., Kucharczyk, D., 2015. Artificial reproduction of percid fishes. In: Kestemont, P., Dabrowski, K., Summerfelt, R.C. (Eds), *Biology and Culture of Percid Fishes*. Springer, pp. 123–161.
- Źarski, 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.
- Zohar, Y., 1996. New approaches for the manipulation of ovulation and spawning in farmed fish. *Bulletin of National Research Institute of Aquaculture* 2: 43–48.

**Odborný externí oponent**

*prof. Dr. Ing. Jan Mareš*

*Mendelova univerzita v Brně, Oddělení rybářství a hydrobiologie, Zemědělská 1,  
613 00 Brno, [www.mendelu.cz](http://www.mendelu.cz)*

**Odborný interní oponent**

*prof. Ing. Otomar Linhart, DrSc.*

*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](http://www.frov.jcu.cz)*

**Ověření a uplatnění technologie 2020,**

*ŠTIČÍ LÍHEŇ – ESOX, Jordánská 366/1, 390 01 Tábor*

**Adresa autorského kolektivu**

*Ing. Jindřiška Knowles, Ing. Peter Podhorec, Ph.D.*

*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](http://www.frov.jcu.cz)*

*V edici Metodik (Technologická řada) vydala Jihočeská univerzita v Českých  
Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Vodňany, [www.frov.jcu.cz](http://www.frov.jcu.cz)  
odborný editor: prof. Ing. Martin Flajšhans, Dr.rer.agr.; redakce: Zuzana Dvořáková  
náklad: 200 ks, 1. vydání, vytištěno v roce 2021, grafický design a technická realizace:  
Jesenické nakladatelství Jena Šumperk.*

