

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Fakulta rybářství a ochrany vod

Ústav akvakultury a ochrany vod

Bakalářská práce

**Využití přípravků umožňujících kontrolované
uvolňování hormonální látky v umělé reprodukci
vybraných druhů ryb – Štika obecná**

Autor: Pecha Oldřich

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Peter Podhorec, Ph.D.

Konzultant bakalářské práce: Ing. Jindřiška Matějková

Studijní program a obor: B4103 Zootechnika, Rybářství

Forma studia: Prezenční

Ročník: 3

České Budějovice, 2019

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona 111/1998 Sb. v platném znění, souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě, případně v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných FROV JU. Zveřejnění probíhá elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne:

.....

Oldřich Pecha

Poděkování:

Tímto bych velmi rád poděkoval vedoucímu mé bakalářské práce Mgr. Peterovi Podhorcovi, Ph.D. a konzultantce Ing. Jindřišce Matějkové za jejich odborné rady a pomoc při vypracování této bakalářské práce. Dále bych chtěl poděkovat všem, kteří se na projektu podíleli a vložili do něj své úsilí. Mé díky patří také rodině, která mi byla po celou dobu velikou oporou.

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
Fakulta rybářství a ochrany vod
Akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE
(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Oldřich PECHA**
Osobní číslo: **V16B019P**
Studijní program: **B4103 Zootechnika**
Studijní obor: **Rybářství**
Název tématu: **Využití přípravků umožňujících kontrolované uvolňování
hormonální látky v umělé reprodukci ryb**
Zadávací katedra: **Ústav akvakultury a ochrany vod**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Cíl práce:

Intenzivní akvakultura je plně závislá na násadovém materiálu původem z umělého nebo poloumělého výtěrů. Nevyhnutelnost hormonálně indukovaného výtěru pramení z neschopnosti většiny hospodářsky významných druhů ryb podstoupit finální zrání gamet v kontrolovaných podmínkách. Příčinou této reprodukční dysfunkce je absence environmentálních podnětů nezbytných k pozitivní stimulaci neuroendokrinního řízení finálních stádií gametogenezi. Vedle typu hormonálního ošetření je ale zásadním faktorem ovlivňujícím účinnost preparátu forma jeho administrace. V případě "klasické" aplikace v podobě hormonálního preparátu rozpuštěného ve fyziologickém roztoku je výraznou překážkou rychle postupující enzymatická degradace administrovaného peptidu snižující jeho účinnost. Po podání dosáhne koncentrace peptidu v plazmě svého maxima a poté klesá. K udržení efektivní hladiny přípravku je proto zapotřebí opakovaného podání (stres a časté úmrtí cenného chovného materiálu), jinak klesá plazmatická koncentrace peptidu pod terapeutickou hladinu. S rozvojem mikro biotechnologií se otevírají nové možnosti efektivní administrace biologicky aktivních látek do rybího organismu ve formě mikročástic umožňujících uvolňování navázané hormonální látky v požadované dávce a po stanovený čas. Významným faktorem je i ochrana účinné látky před nežádoucími vlivy okolního prostředí či možnost řízeného uvolňování navázané účinné látky. Zvyšuje se tak účinnost preparátu, snižuje se výskyt nežádoucích účinků a celková dávka léčiva potřebná k terapii je menší. Díky tomu je možné udržet terapeutickou hladinu LH v krevní plazmě po potřebnou dobu blížící se fyziologickým nárokům ošetřovaných druhů. V případě mikročástic se jako nosiče hormonálních látek v humánní medicíně s úspěchem využívají mikrosféry tvořené kopolymerem kyseliny mléčné a glykolové (PLGA) nebo kyseliny polymléčné (PLA). Mikrosféry jsou matricové systémy, u nichž je léčivo rozptýleno uvnitř polymerové matrice vyznačující se biokompatibilitou a biologickou odbouratelností.

Hlavní činnosti budou spočívat v in vivo evaluaci účinnosti připravených hormonálních přípravků u hospodářsky významných druhů ryb (štika obecná, candát obecný, sumeček africký). Cílem je identifikovat druhově nebo skupinově optimální přípravky na bázi PLGA mikročástic z hlediska délky a intenzity uvolňování a složení účinné látky (GnRHa, metoclopramide).

Metodický postup zpracování tématu bakalářské práce:

A/ Studium literatury a vypracování literárního přehledu na řešené téma

B/ Experimentální práce:

1/ Identifikace připravenosti experimentálních jedinců na výtěr. Odběr vzorku oocytů za pomoci ovariální katetrizace (Stoeckel, 2000). Přes urogenitální papulu se do vaječníku zavede silikonový katétr a podtlakem se odebere vzorek oocytů. Následně se vyhodnotí míra migrace jádra a připravenost na výtěr.

2/ Několikadenní aklimatizace s následní aplikací testovaných variant hormonálního přípravku na základě PLGA a faktorů hypothalamu.

3/ Odběr vzorků krve pomocí heparinizované injekční stříkačky a jehly. Krevní vzorky se odstředí s následným oddělením krevní plazmy a její uskladněním v hluboko mrazicím boxu.

5a/ V krevní plazmě jikernaček se bude stanovovat koncentrace Estradiolu, Testosteronu a 17alpha, 20beta-dihydroxy-4-pregnen-3-one pomocí komerčně dostupných ELISA kitů společnosti Cayman a Diasource.

5b/ V krevní plazmě mlíčáků se bude stanovovat koncentrace 11-ketotestosteronu, Testosteronu a 17alpha, 20beta-dihydroxy-4-pregnen-3-one pomocí komerčně dostupných ELISA kitů společnosti Cayman a Diasource.

6a / Vyhodnotí se celkový počet ovulujících jikernaček, relativní plodnost, fertilita, líhivost.

6b / Vyhodnocovat se bude objem, hustota, rychlost pohybu spermatu a osmolalita seminální plazmy.

7 / Statisticky se vyhodnotí vliv hormonální léčby na organismus cílového druhu

Rozsah grafických prací: dle potřeby (do 10 stran)

Rozsah pracovní zprávy: 30-50 stran

Forma zpracování bakalářské práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

- Breton, B., C. Weil, et al. (1990). Effects of acute versus sustained administration of GnRHa on GtH release and ovulation in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 91(3-4): 373-383.
- Clearwater, S. and L. Crim (1998). Gonadotropin releasing hormone-analogue treatment increases sperm motility, seminal plasma pH and sperm production in yellowtail flounder *Pleuronectes ferrugineus*. *Fish Physiology and Biochemistry* 19(4): 349-357
- Duncan, N. J., D. Alok, et al. (2003). Effects of controlled delivery and acute injections of LHRHa on bullseye puffer fish (*Sphoeroides annulatus*) spawning. *Aquaculture* 218(1): 625-635.
- Forniés, M., E. Mañanós, et al. (2001). "Spawning induction of individual European sea bass females (*Dicentrarchus labrax*) using different GnRHa-delivery systems." *Aquaculture* 202(3): 221-23.
- Mylonas, C. C. and Y. Zohar (2000). Use of GnRHa-delivery systems for the control of reproduction in fish." *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 10(4): 463-491.
- Mylonas, C., Y. Tabata, et al. (1995). Preparation and evaluation of polyanhydride microspheres containing gonadotropin-releasing hormone (GnRH), for inducing ovulation and spermiation in fish." *Journal of Controlled Release* 35(1): 23-34.

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Peter Podhorec, Ph.D.**
Ústav akvakultury a ochrany vod


Konzultant bakalářské práce: **Ing. Jindřiška Matějková**

Datum zadání bakalářské práce: **5. ledna 2018**

Termín odevzdání bakalářské práce: **3. května 2019**


prof. Ing. Pavel Kozák, Ph.D.
děkan

L.S.


doc. Ing. Jan Mráz, Ph.D.
ředitel

V Českých Budějovicích dne 15. ledna 2018

OBSAH

1	ÚVOD.....	9
2	LITERÁRNÍ PŘEHLED	10
2.1	Štika obecná	10
2.1.1	Taxonomické zařazení	10
2.1.2	Zeměpisné rozšíření	10
2.1.3	Charakteristika čeledi Esocidae a popis zkoumaného druhu.....	11
2.1.4	Nároky na chov	13
2.2	Reprodukce ryb	13
2.2.1	Hormonální řízení ovulace.....	14
2.2.1.1	GnRH.....	15
2.2.1.2	GnRH receptory.....	16
2.2.1.3	Dopamin	16
2.2.1.4	Gonadotropní hormony	17
2.2.1.5	Ovariální hormony.....	17
2.2.1.6	Ovulace.....	18
2.2.1.7	Spermatogeneze.....	18
2.2.2	Reprodukce v přírodě a v akvakultuře	20
2.2.2.1	Přirozený výtěr	21
2.2.3	Reprodukční dysfunkce	21
2.2.4	Náprava reprodukčních dysfunkcí	22
2.2.4.1	Preparáty na bázi gonadotropinů.....	22
2.2.4.2	Faktory hypotalamu	23
2.2.4.3	Poloumělý výtěr.....	24
2.2.4.4	Umělý výtěr	25
2.2.5	Inkubace a kulení váčkového plůdku.....	28
3	MATERIÁL A METODIKA	29
3.1	Chovné podmínky	29
3.2	Experimentální ryby.....	30
3.2.1	Umělý výtěr	30
3.3	Použité chemické přípravky	31
3.4	Vyhodnocení získaných výsledků.....	35
3.4.1	Analýza koncentrace hormonů	35

3.4.2	Analýza mlíčí	35
3.4.3	Analýza výtěrových parametrů	36
3.4.4	Statistické vyhodnocení výsledků	36
4	VÝSLEDKY	37
4.1	Experiment – Mlíčáci 2018	37
4.2	Experiment – Jikernačky 2019	42
5	DISKUSE	46
6	ZÁVĚR	53
7	PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY	55
8	SEZNAM PŘÍLOH	66
9	PŘÍLOHY	67
10	ABSTRAKT	80
11	ABSTRACT	81

1 ÚVOD

Česká republika se historicky řadí mezi rybářskou špičku. Naše vody disponují širokou škálou sladkovodních druhů ryb, mezi kterými najdeme zástupce všech článků potravního řetězce. V poslední době je náš zrak upřen především na dravce a ohrožené druhy, jejichž počty se stále snižují. Důvodem je mnoho změn ve vodním prostředí, které se v posledním desetiletí přihodily. Říční toky prochází napřimováním a čištěním dna, čímž se snižuje počet úkrytů, které jsou pro dravce nutností pro úspěšný lov. Bagrováním dna a břehů dochází rovněž k destrukci ploch se specifickým substrátem pro kladení jiker. Chemické a fyzikální vlastnosti vody přestávají být vhodné pro úspěšnou reprodukci ryb ve všech povrchových vodách (Randák a kol., 2015). Aby byla reprodukce efektivnější, provádí se umělý výtěr mnoha druhů ryb v líhních za pomoci hormonálních stimulantů. Cílem je získat co nejvyšší počet zralých ovulovaných jiker, které budou moci pokračovat ve svém vývoji. Nejpoužívanějšími hormonálními preparáty jsou v současnosti kapří hypofýza a synteticky vyrobené GnRH analogy v kombinaci s dopamin antagonisty. Umělá reprodukce štiky obecné (*Esox lucius*) je velmi problematická. Štika je citlivá na manipulaci i stres a ovulace jiker je značně nesynchronní. Proto je potřeba kontrolovat ji několikrát, což vede k téměř sto procentnímu úmrtí jedince. Její odezva na hormonální ošetření je slabá. Kromě nízké oplozenosti a líhnivosti jiker se potýkáme s problémem nízké produkce spermatu, což často končí nutností zabíjení samců a použití testikulárního spermatu.

Náplní práce byla optimalizace umělého výtěru štiky obecné pomocí nového typu hormonálního přípravku a tím přispět ke zvýšení její akvakulturní produkce. Cílem práce bylo zjistit správnou koncentraci hormonálních látek navázaných na mikročástice, která by indukovala ovulaci jiker. Výtěr by tak byl synchronní a umělá reprodukce efektivnější.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Štika obecná

2.1.1 Taxonomické zařazení

Štika obecná (*Esox lucius*) patří mezi paprskoploutvé ryby (Actinopterygii), do řádu štikotvární (Esociformes), čeledi štikovití (Esocidae), rodu *Esox* (Dubský a kol., 2003). Čeleď Esocidae zahrnuje pouze 1 rod se 7 druhy. Rod *Esox* má v současné době 7 zástupců a to štika obecná (*Esox lucius*), štika americká (*Esox americanus*), štika černá (*Esox niger*), štika muskalunga (*Esox maquinongy*), štika amurská (*Esox reichertii*), *Esox cisalpinus* a *Esox aquitanicus*, přičemž si jsou všechny velmi podobné a rozdíly mezi nimi nacházíme na úrovni drobných detailů na těle a jiného zbarvení (Reiser, 1996).

2.1.2 Zeměpisné rozšíření

Štiky se s výjimkou Arktidy vyskytují téměř po celé severní polokouli, přičemž nejvyšší hustotu jejich výskytu sledujeme v Evropě a severní Americe. Areál rozšíření štiky obecné je poměrně široký. V Evropě se vyskytuje od Anglie a Irska, přes Francii, Itálii (jen po Tiberu) až k pobřeží Černého moře (Lusk a kol., 1992). Její výskyt je potvrzen i v povodí Dunaje, pobaltských státech a Finském zálivu. Jedinými místy v Evropě, kde štikou obecnou nenalezneme, jsou části jižní Evropy s vyššími teplotami, které štikám nesvědčí. Patří sem Řecko, část Balkánského poloostrova a Pyrenejský poloostrov, kam však probíhaly pokusy o její introdukci (Baruš a Oliva, 1995a). Štika obecná obývá rozsáhlá území bývalého Sovětského svazu, kde ji nalezneme ve všech sibiřských řekách, dále pak v jejím jižním areálu rozšíření v povodí řek Volha, Ural, Kura a Amudarja. Daří se jí také v Kaspickém a Aralském moři. Vyskytuje se i na dálném východě od jezer Bajkal a Balchaš až k Čukotskému poloostrovu. Obývá také vody Severní Ameriky od Aljašky přes povodí Velkých jezer až k řece Mississippi (Holčík, 1998). V našich podmínkách se vyskytuje ve všech vhodných biotopech, tedy stanovištích s klidnou vodou, členitým terénem a příbřežní vegetací. Nalézt ji můžeme ve všech vodách nížin, stojatých i tekoucích, v údolních nádržích i jezerech. Proniká vysoko proti proudu i do pstruhového pásma, kde je velkým škůdcem (Reiser, 1996). Primárně patří mezi sladkovodní druhy ryb, avšak její výskyt byl prokázán i

v brakických vodách, například v Baltickém moři, kde se salinita pohybuje kolem 10‰ (viz obr.č.1) (Scott a Crossman, 1985).



Obr.č.1: Rozšíření štiky obecné (*Esox lucius*) (Linné, 1758).

2.1.3 Charakteristika čeledi Esocidae a popis zkoumaného druhu

Čeď štikovitých je skupinou rybích predátorů lovcí svou kořist ze zálohy. Všichni zástupci si jsou morfologicky velmi podobní, navzájem se od sebe odlišují v drobných detailech či ve zbarvení těla. Preferují klidnější vody s dostatkem úkrytů, které si aktivně hlídají. Z nich potom prudkými výpady útočí na svou kořist. Štiky jsou známé pro svůj apetit, jsou velmi žravé a agresivní. Jsou schopné pojídat i své druhy a to od doby, kdy se jejich tělesná délka pohybuje kolem 3 – 4 cm. Pozřou i kořist, která se rovná polovině délky jejich vlastního těla. Pro svou útočnost jsou vyhledávány mezi sportovními rybáři (Dubský a kol., 2003). Má robustní, shora silně zploštělou hlavu s velikými očima umístěnými uprostřed hlavy a široce rozevíratelnými ústy, které jsou opatřeny ostrými zuby. Ty se nacházejí na dolní čelisti, na mezičelistech, na patrových kostech, na radličné kosti a na kosti jazylkové. Horní čelist je bezzubá. Stejně jako další zástupci štikovitých má hřbetní a řitní ploutev posunutou dozadu k ocasní ploutvi. První ploutve jsou pak posunuté směrem dopředu a jsou umístěné těsně za hlavou. Ocasní ploutev bývá hluboce vykrojená. Toto postavení ploutví a torpédovitý tvar těla umožňuje prudký start k uchvácení kořisti. Zbarvení těla je závislé na stáří ryby a na prostředí, ve kterém žije. Starší jedinci bývají zpravidla výrazněji zbarvení než mladší.

Ryby žijící ve stále zakalených vodách bývají světlejší než ryby žijících v čistých a zastíněných vodách. Základní zbarvení hřbetu je tmavě zelené se světlejšími boky, poseté žlutozelenými skvrnami místy přecházejícími v příčné pruhy. Břicho je bílé. Párové ploutve jsou žlutobílé barvy s mírným načervenalým nádechem. Nepárové ploutve jsou tmavší s tmavými skvrnami. Běžně dorůstá délky 50 až 80 cm a dosahuje hmotnosti od 1 do 3 kg. Jsou známé i rekordní úlovky o délce přes 1,5 m a hmotnosti přes 40 kg (Dubský a kol., 2003). Štika patří mezi naše nejrychleji rostoucí druhy ryb, vyznačuje se vysokou žravostí, což ve vhodných podmínkách stojí za jejím rychlým růstem (Lusk a kol., 1992). Její délkový růst je nejvýraznější v prvním roce života, kdy běžně dorůstá do délky 16 – 25 cm. V extrémních podmínkách pak až 50 cm, vše záleží na potravní nabídce. U štik je známý kanibalismus, ke kterému dochází přibližně po 3 – 4 týdnech, kdy dosahuje kolem 3,5 cm celkové délky a přechází na dravý způsob života. V tomto okamžiku požírají i své menší druhy, což spěje k jejich rozrůstání. Mlíčáci rostou pomaleji než jikernačky, ty se zároveň dožívají vyššího věku. Štika je ryba dožívající se obvykle 3-5 let, výjimečně až 25 let (Baruš a Oliva, 1995a).

Štika preferuje stanoviště s klidnou vodou a členitým terénem, kde nachází dostatek vhodných úkrytů. Ty jsou tvořeny kameny, potopenými keři, stromy, větvemi i antropogenním odpadem. V rychleji proudících tocích vyhledává místa s klidnější vodou, například v prohlubních, za kameny nebo v bočních ramenech. V rybnících a jiných velkých vodních nádržích se zdržuje vždy při pobřeží. V rybníčních břehových partiích nachází dostatek úkrytů v travních porostech a prostorově si tak příliš nekonkuruje s candátem (Baruš a Oliva, 1995a). Jedná se o teritoriální rybu, která si aktivně hájí své stanoviště a málokdy migruje mimo své území. Bylo zjištěno, že na stejném místě (do 100 m) bylo opakovaně chyceno až 89% ryb, které byly již jednou uloveny a to i po několika letech. Štiky opouští svá stanoviště a migrují hlavně ve spojitosti s reprodukcí, kdy vytahují proti proudu a do travnatých mělčin. U některých jedinců však byla zjištěna větší migrace. U těch byla pozorována lepší kondice a rychlejší růst (až dvojnásobný) a to kvůli tomu, že nebyli závislí na tom, jaká potrava připlula, častěji lovíli, a tak málo hladověli (Baruš a Oliva, 1995a). Nejaktivnější je ráno, naopak nejmenší aktivitu vykazuje v nočních a večerních hodinách. Podle některých autorů migrují vysazované štiky častěji než „domácí“ jedinci. Nepatří mezi druhy ryb náročné na kvalitu prostředí. Nevadí jí eutrofní typ vod a dobře odolává i v prostředí s intenzifikací chovu kapra (Dubský a kol., 2003). Má raději teplejší vodu, ve které lépe roste. Optimální teplota vody pro příjem a trávení potravy se pohybuje kolem 16 –

20 °C. Toleruje však teplotu vody až do 30°C. Na obsah kyslíku je náročnější než kapr a nesnáší nižší hodnoty pH. Je však schopná žít v brakických vodách, kde se dokonce při salinitě 8‰ vytírá (Hanel a Lusk, 2005). Nevyhovují ji zabahněné rybníky s trvalým zákalem vody (Čítek a kol., 1998). Štika je denní dravec, který v noci odpočívá. Po neúspěšném útoku svou kořist dlouho nepronásleduje (Hanel a Lusk, 2005).

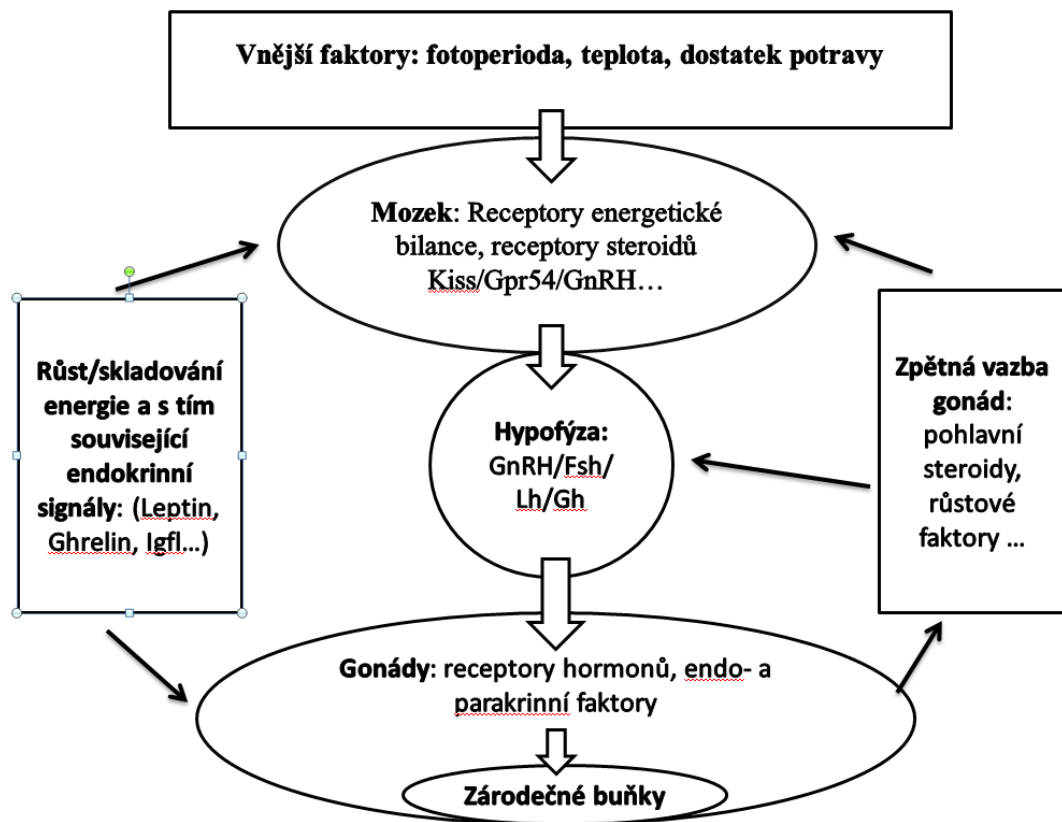
2.1.4 Nároky na chov

Většinu dne tráví ve svém teritoriu ukrytá mezi kameny, větvemi či v jiném vhodném úkrytu. Proto se její nasazování do rybníků a vodních nádrží odvíjí nejen podle vodní plochy, ale především podle dostatku vhodných úkrytů (Mareš a Burleová, 1983). Ve všech vodách plní funkci zdravotní policie, kdy odklízí nemocné a slabší jedince. Patří mezi fytofilní druhy, a tak jsou pro ni vhodné rybníky a toky s příbřežní vegetací, kam klade jikry (Baruš a Oliva, 1995a; Čítek a kol., 1998). Její celkový růst se odvíjí od dostatku potravy a vhodných úkrytů a to již od raných stádií. Potravu začíná přijímat ještě před úplnou resorpcí žloutkového vaku, při velikosti 11 mm, kdy se živí zooplanktonem, především středně velkými buchankami a perloočkami. Postupně začíná přijímat velké perloočky, bentos a nepohrdne ani larvami hmyzu, vodním hmyzem, plůdkem ryb i svými sourozenci (Dubský, 1998).

2.2 Reprodukce ryb

Živé organismy jsou definovány několika biologickými vlastnostmi. Jednou z nich je schopnost reprodukce, schopnost předávat geny další generaci. Tato schopnost zajišťuje rozmanitost a kontinuitu života, bez které by ani samotná evoluce nebyla možná. Ryby se rozmnožují zpravidla pohlavně. To znamená, že nový jedinec vzniká splynutím vajíčka a spermie, při čemž získává polovinu genů od každého z rodičů. Takto vzniklý jedinec je svou genetickou výbavou zcela originální. Aby rozmnožování proběhlo úspěšně, tj. produkce oplození schopných, plnohodnotných pohlavních buněk a nerušený vývoj nového jedince, je zapotřebí správná funkce pohlavního ústrojí. Pohlavní orgány produkují hormony, které jsou při rozmnožování takřka všech organismů zcela zásadní. Kaskáda hormonů podél reprodukční osy „hypotalamus –

hypofýza – gonády“ (viz obr. č.2) pak reguluje gametogenezi a finální zrání gamet (Peter a Yu, 1997).



Obr. č.2: Zjednodušené schéma reprodukční osy ryb: Hypotalamus – hypofýza – gonády (G.L. Taranger a kol., 2010)

2.2.1 Hormonální řízení ovulace

Vnější a vnitřní faktory hrají významnou roli při hormonálním řízení reprodukce. Mezi vnitřní faktory řadíme především zdravotní stav a kondici jedince, způsob chovu, hygienu a kvalitu výživy generačních ryb. Hlavními vnějšími faktory jsou světelný režim, teplotní režim a chemismus vody. Přičemž nejde jen o aktuální stav faktoru, ale hlavně o velikost změny, tudíž zvyšování či snižování teploty, nebo prodlužování a zkracování délky světelného dne (van der Kraak, 1983). Mezi další významné vnější faktory patří: obsah rozpuštěného kyslíku, obsah odpadních dusíkatých látek, ve výtěrovém období přítomnost výtěrového substrát a také přítomnost druhého pohlaví, či přítomnost celého výtěrového hejna. Informace přijímá a vyhodnocuje centrální nervová soustava (CNS) (Matty, 1985). Když CNS vyhodnotí vnější a vnitřní podmínky

jako ideální pro reprodukci, dojde k vylučování gonadotropin uvolňujícího hormonu (GnRH), který je nejsilnějším stimulantem předovulačního zvýšení množství luteinizačního hormonu (LH), jež je nezbytně nutný pro iniciaci steroidogeneze a následné ovulace (Pankhurst, 1998).

2.2.1.1 **GnRH**

Gonadotropin uvolňující hormon je chemickou strukturou neurodecapeptid hypotalamického původu (Jelínek a kol., 2003) a je hlavním regulátorem sekrece LH (Kah a kol., 2007). U ryb se GnRH podařilo identifikovat poprvé u druhu losos keta (*Oncorhynchus keta*), avšak vůbec poprvé se podařilo izolovat GnRH z hypotalamu savců ve složení: pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂ (Sherwood a kol., 1994). Počet identifikovaných GnRH forem stále narůstá. V posledním desetiletí se u obratlovců zvýšil na 14 (Adams a kol., 2003). Do této doby bylo u ryb identifikováno osm forem GnRH, tím se ryby stávají skupinou vykazující největší počet GnRH variant mezi všemi obratlovci (Sherwood a kol., 1983). GnRH formy se odlišují zastoupením aminokyselin v peptidovém řetězci (Bosma a kol., 2000). Podle předpokládané funkce a lokalizace v mozku tvoří identifikované GnRH formy tři monofyletické skupiny (Fernald a White, 1999). Rybí druhy produkují minimálně dvě až tři formy GnRH (Lethimonier a kol., 2004). Rozdíl mezi nimi nalézáme v aminokyselinové sekvenci (Dubois a kol., 2002). Skupinu I (GnRH-I) tvoří formy GnRH, kterým se připisuje největší úloha při regulaci sekrece LH s místem produkce v hypofýze a přední části hypotalamu (King a Millar, 1995). Do této skupiny patří např. kuřecí-I (cGnRH-I), pražmový (sbGnRH), sumcový (cfGnRH) nebo savčí (mGnRH) (Dubois a kol., 2002). Skupina II (GnRH-II) zahrnuje pouze kuřecí (cGnRH-II), které je uvolňováno ze segmentu středního mozku. Tato forma má prokázaný vliv na příjem potravy a na sexuální chování (Guilgur a kol., 2006; Kah a kol., 2007; Miyamoto a kol., 1984). Do skupiny III (GnRH-III) spadá jenom lososové GnRH (sGnRH), jež se vyskytuje pouze u ryb, produkované čichovými laloky, předním mozkem a terminálním nervem (Okubo a Nagahama, 2008; White a kol., 1998). Tato forma GnRH má hlavní úlohu při regulaci sekrece LH u rybích druhů, které postrádají GnRH formy ze skupiny I. Lososové GnRH se syntetizuje v nervových buňkách hypotalamu a endoplazmatickém retikulu, ze kterého je předán do Golgiho komplexu, kde dochází k balení do granulí ohraničených membránou. Granule putující v axonech jsou z nervových zakončení uvolňovány na

základě změny akčního potenciálu (Fink, 1988). U kostnatých ryb chybí hypotalamo – hypofyzární portální systém, a proto jsou granule GnRH transportovány u nervových vláken přes hypofyzární stopku k nervovým zakončením, které jsou v těsné blízkosti adenohypofýzy (Van der Kraak a kol., 1989). U saveců pozorujeme tzv. koordinovanou pulzační sekreci, která zajišťuje uvolňování GnRH. Tento způsob je pravděpodobně vyvinutý i u ryb. Pulzační sekrece z nervových zakončení vytváří pulzační, která je důležitá pro stimulaci sekrece LH (Yaron a kol., 2003; Hotchkiss a Knobil, 1994).

2.2.1.2 GnRH receptory

GnRH receptory jsou důležité struktury, bez kterých by se účinek GnRH nemohl projevit. GnRH rozpozná a následně se naváže na specifické GnRH receptory (GnRH-R), čímž uplatní svoji úlohu (Blomenröhr a kol., 2005). Chemickou strukturou se jedná o polypeptidový řetězec, přecházející sedmkrát přes lipidovou dvouvrstvu, střídající vnitrobuněčné a mimobuněčné sekvence (Sealfon a kol., 1997). GnRH-R patří do skupiny receptorů spojených s G proteinem (GPCR) (Cardinaud a kol., 1998). Typická struktura GPCR se skládá ze tří hlavních funkčních domén: transmembránová doména, C-terminální cytoplazmatická doména, N-terminální intracelulární a extracelulární doména (Blomenröhr a kol., 2002). V současné době jsou GnRH-R rozděleny na dva typy. Typ I nemá koncovou intracelulární část a má největší afinitu k mGnRH-I. Naopak koncovou intracelulární část má typ II a zároveň má větší afinitu k cGnRH-II (Sealfon a kol., 1997).

2.2.1.3 Dopamin

Dopamin (DA) působí inhibičně ve vztahu k vylučování LH a zároveň antagonisticky vůči působení GnRH. Jeho hlavním úkolem je zabraňování předčasnému (nechtěnému) dozrávání pohlavních produktů (především jiker) či jejich dozrávání v nevhodných podmínkách. Chemickou strukturou se jedná o katecholaminní neurotransmitter (Dufour a kol., 2005). Hladina estradiolu (E2) je nejspíše předním faktorem tlumícího účinku dopaminu v průběhu vitelogeneze (Senthilkumara a Joy, 1995). DA se projevuje narušením intracelulární signalizační GnRH kaskády (Chang a kol., 1993) rovněž také redukcí počtu vazebných míst – receptorů pro GnRH

umístěných na gonadotropních buňkách (de Leeuw a kol., 1989). Zároveň i zabráněním vylučování GnRH z nervových zakončení v hypofýze (Yu a Peter, 1992). Existují dvě hlavní skupiny DA receptorů, zprostředkovávající jeho inhibiční účinky (Dufour a kol., 2010), od sebe se odlišují schopností aktivovat D1 nebo naopak inhibovat D2 enzym adenylátcyklázu (Kebabian a Calne, 1979). Avšak i přes důkladný výzkum se u druhu *Micropogonias undulatus* z řádu ostnoploutvých neprokázala inhibice sekrece GtH za použití DA (Copeland and Thomas, 1989).

2.2.1.4 Gonadotropní hormony

Jak sám název napovídá, jedná se o hormony kontrolující činnost gonád. Kromě gonád ovlivňují také činnost štítné žlázy. Místem syntézy a sekrece těchto hormonů je adenohypofýza. Jde o dva rozdílné hormony, které byly pojmenovány na základě jejich působení na gonády – luteinizační hormon (LH) a folikuly stimulující hormon (FSH) (Bentley, 1998). Účinky těchto hormonů byly až do konce 80. let minulého století připisovány pouze jedinému z těchto hormonů s gonadotropním účinkem. Tento pohled se však změnil po objevu dvou různých gonadotropních hormonů u lososa během výzkumu z konce 80. let (Kawauchi a kol., 1989). Chemickou strukturou se jedná o proteiny o molekulové hmotnosti zhruba 3000 s přibližně 12 – 20% zastoupením sacharidů. Hormony jsou tvořeny dvěma neidentickými podjednotkami (α a β) spojené nekovalentní vazbou. Strukturou i původem byly podobné hormony nalezeny u zástupců všech tříd obratlovců (Bentley, 1998).

2.2.1.5 Ovariální hormony

Indukce dozrávání oocytů

LH podněcuje dozrávání oocytů stimulací buněk folikulů. Ty následně syntetizují dozrávání indukující steroidy (MIS). Studie různých druhů ryb dokazují, že nejúčinnějším steroidem na konečné dozrávání oocytů je $17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one (Nagahama a kol., 1995).

Ovariální steroidní zpětná vazba

Účinky pohlavních hormonů vyvolávají zpětnou vazbu, která působí na mozek a podvěsek mozkový. Tím je umožněna integrace s environmentálními podněty a nárůst předovulační úrovně LH (Aida, 1988). Zvýšené hladiny estradiolu (E2) a testosteronu (T) jsou důležité pro dosažení správné předvýtěrové hladiny LH (Kobayashi a kol., 1989). Výtěrové období a stupeň vývoje gonád představuje hlavní faktor pro uplatnění zpětné vazby (Navas, 1995).

Prostaglandiny

Jedná se o fyziologicky aktivní látky. Prostaglandiny (PG) jsou syntetizovány téměř ve všech tkáních a orgánech. Především však ve stěnách cév, semenných váčcích a ledvinách. Na základě vzniku z esenciálních mastných kyselin se podobají vitamínům. Řadou svých účinků připomínají tkáňové hormony (Jelínek a kol., 2003). Ovulaci u ryb zprostředkovává PG z řady F (PGF) (Goetz, 1983). Na syntéze PGF se účastní řada proteinů: kináza C, lipoxigenáza cyklooxygenáza metabolismu kyseliny arachidonové a vlastní syntéza je stimulována MIS (Patiño, 2003). Vyšší syntéza PG indukovaná pomocí MIS nebo LH se zdá být obecným požadavkem pro LH vyvolanou ovulaci (Goetz a kol., 1991).

2.2.1.6 Ovulace

Ovulace je proces, při kterém dochází ke změnám ve skladbě stěny folikulu a zvýšení nitrofolikulárního tlaku, což vede k jejímu prasknutí a vyplavení vajíčka, které přechází do vejcovodu (Jelínek a kol., 2003). U kostnatých ryb se ovulace vyznačuje také vysokým nárůstem sekrece luteinizačního hormonu (Kime, 1993).

2.2.1.7 Spermatogeneze

Obecně představuje spermatogeneze určitý vývojový proces, při kterém malé množství diploidních (2n) buněk produkuje velké množství vysoce diferencovaných haploidních (1n) buněk (Nóbrega a kol., 2009). Spermatogeneze bezblanných obratlovců, kam řadíme paryby, ryby a obojživelníky se liší od blanatých obratlovců (plazi, ptáci, savci). Spermatogeneze u bezblanných obratlovců probíhá následovně: ze

zárodečných buněk se tvoří nediferencované spermatogonie typu A → následuje jejich růst a mnoho morfologických změn, díky kterým postupně vznikají spermatogonie typu B → po ukončení mitózy se spermatogonie typu B diferencují do primárních spermatocytů, z nichž po prvním meiotickém dělení vznikají sekundární spermatocyty → z nich po druhém meiotickém dělení vznikají spermatidy (Schulz a kol., 2010). Pro ryby je charakteristický cystický typ spermatogeneze (Callard, 1996). Ten se vyznačuje tím, že uvnitř spermatogenetických tubulů se tvoří cytoplazmatická membrána Sertoliho buněk cisty, které obklopují synchronně se vyvíjející skupiny zárodečných buněk a zmíněné Sertoliho buňky mají schopnost množit se i u dospělých jedinců ryb (Schulz a kol., 2005). Spermatogeneze lze dle struktury testes rozdělit na tubulární a lobulární typ (Billard, 1986). U tubulárního typu se v centru varlete vyskytuje velká dutina, ve které jsou uloženy spermie. Okolo této dutiny se nacházejí tubuly, které směřují od dutiny směrem k obvodu varlete (Billard, 1972). Ve vrcholech těchto tubulů se nalézají zárodečné buňky a nediferencované spermatogonie. Raná stádia spermatogonií tvoří cisty, které v průběhu spermatogeneze postupují do centra varlete. Tímto typem disponuje například živorodka duhová (Billard, 1986). Naopak u lobulárního typu vytváří pojivová tkáň nepravidelné tubuly, které jsou lemovány epitelem se Sertoliho buňkami a zárodečnými buňkami. Na rozdíl od tubulárního typu se spermatogonie typu A vyskytují okolo lobulů, nikoliv v jejich vrcholcích. Během spermatogeneze sestupují cisty přímo do středu lobulů. Na konci procesu spermatogeneze jsou spermie uvolňovány do lobulárních lumenů, z nichž se dostávají do vývodných kanálků testes (Billard, 1972; Billard 1982). Lobulární testes se vyskytuje především u kostnatých ryb, například u kaprovitých a lososovitých (Billard, 1986). V celém procesu hraje zásadní roli hormon 11-ketotestosteron. Jedná se o steroidní hormon vykazující androgenní aktivitu. Stimuluje spermatogenezi a spermiogenezi prostřednictvím růstových faktorů. Na jeho produkci má vliv LH, působící na Leydigovy buňky a FSH, působící na Sertoliho buňky. Oba typy buněk následně uvolňují 11-ketotestosteron. U některých druhů, například v případě lososa nerka (*Oncorhynchus nerka*), byl prokázán vliv tohoto hormonu i na zbarvení těla, masa a zesílení kůže (Idler a kol., 1961).

2.2.2 Reprodukce v přírodě a v akvakultuře

Jakmile se na jaře zvýší teplota vody na 7°C (Lusk a kol., 1992), začíná kaskáda výtěrů většiny druhů ryb obývajících naše vody. Ihned po odstupu ledu přichází doba tření štiky obecné. Zpravidla to bývá v březnu a začátkem dubna, kdy kvete podběl lékařský (*Tussilago farfara*). V teplejších oblastech (oblast Moravy) nebo po teplé zimě může k výtěru docházet i v únoru. Na druhou stranu po dlouhých zimách či v chladnějších místech může výtěr probíhat až koncem dubna (Vysočina). Pohlavní dospívání je určováno zeměpisnou polohou lokality (Baruš a Oliva, 1995). Ve Španělsku, kde byla štika aklimatizována, dospívají samci a samice velice časně, z velké části již koncem prvního roku života (31-45cm). Kouřil a Hamáčková, (1975) zjistili na materiálu z vodňanských rybníků, že samci ve 100 % dospěli v 1. roce života a samice jen v 32 % případů. Toky jsou na jaře plné vody a toho štika velmi ráda využívá. Nabízí se jí více úkrytů, výtěrového substrátu i potravy (někdy proniká až do pruhových vod). Nebojí se vstupovat a vytírat se na zaplavené louky či do zarostlých mělčin s hloubkou vody jen do 30 cm (Baruš a Oliva, 1995a). Teplota vody při výtěru se obvykle pohybuje mezi 7 – 9 °C. Zaznamenány jsou i výtěry při daleko nižších teplotách (od 1,5°C). Doba výtěru štik na jedné lokalitě trvá 2 – 3 týdny (Dubský a kol., 2003). Jako první na trdliště připlouvají mlíčáci, kteří na jikernačky čekají i několik dní před samotným výtěrem. Výtěr je jednofázový. V praxi se setkáváme s rozdílnou zralostí jiker, především u větších jikernaček, kdy je část jiker přezralá, část optimální a zbytek nedozrálý. Na začátku výtěrového období je na trdlištích poměr pohlaví nevyrovnaný, jelikož jikernačku doprovází vždy několik mlíčáků. Postupně se poměr pohlaví vyrovnává. Výtěr je skupinový, probíhá za slunečných dní, když je voda prohřátá, tedy mezi polednem a večerem (Baruš a Oliva, 1995a). Bývá bouřlivý a trvá i několik hodin. Jako první se vytírají mladší a menší jedinci. Pokud je z nějakých podmínek výtěr štiky znemožněn, dochází k resorpci jiker či úhynu jedince (Dubský a kol., 2003).

2.2.2.1 Přirozený výtěr

Štika dosahuje pohlavní zralosti velmi rychle. V našich podmínkách je již na konci prvního roku života plodná většina mlíčáků a menší část jikernaček. Zbylá část populace dozrává ve druhém až třetím roce života. V chladných severských vodách totiž dozrávají později a to až v pátém či šestém roce života, kdy dosahují podobné délky jako 1 – 2 leté štiky z našich vod (Berka a Hamáčková, 1980). Pohlavní dimorfismus je až na pár znaků nevýrazný. Jikernačky jsou zpravidla větší a dožívají se vyššího věku. Před výtěrem je lze rozeznat podle objemu břišní partie a urogenitální papily, která je u jikernaček širší, bez příčné štěrbiny. Má tvar oválné prohlubně, po obvodu s bradavičnatými okraji narůžovělé barvy. Mlíčáci jsou štíhlejší a močopohlavní otvor je štěrbinovitý, připomínající písmeno „T“. Počet jiker vyprodukovaných jikernačkou se pohybuje mezi 25 000 – 30 000 ks/kg jikernačky. Mlíčáci vyprodukují pouze pár kapek mlíčí v rozmezí 0,1- 1,2 ml (Dubský, 1998). Štika patří mezi fytofilní druhy ryb. To znamená, že své jikry klade na vodní či ponořenou vegetaci. Zpravidla je to v blízkosti břehů, kde je prohrátá voda a veliké množství substrátu pro kladení jiker. Avšak možnosti přirozeného rozmnožování štik v našich zregulovaných tocích a odvodněné krajiny jsou dnes značně omezené. V rybníkářství k němu dochází zpravidla samovolně ve hlavních dvouhorkových rybnících a dostatkem výtěrového substrátu a potravní nabídky. V našich podmínkách je přirozený výtěr považován za okrajovou záležitost (Kostomarov, 1958).

2.2.3 Reprodukční dysfunkce

V zajetí se u ryb často setkáváme s reprodukčními dysfunkcemi. Jedná se o dysfunkce způsobené abiotickými a biotickými faktory, které brání samovolnému podstoupení ovulace či spermiace a tím znemožňují samotný výtěr (Zohar a Mylonas, 2001). Chov ryb v umělých podmínkách se výrazně odlišuje od podmínek prostředí, kde se ryby přirozeně vyskytují. Rybám chovaným v zajetí chybí, zejména v předvýtěrovém období, přirozené třecí podněty. Mezi ně patří především vhodný třecí substrát, hloubka, chemické složení vody, atp. (Mylonas a Zohar, 2001). U jikernaček pak pozorujeme špatné dozrávání oocytů s následným selháním ovulace a samotného výtěru (Peter a kol., 1993; Mañanós a kol., 2009; Mylonas a Zohar, 2007). Jikernačky zpravidla úspěšně podstoupí vitellogenezi, ale nedojde k finálnímu dozrání oocytů (FOM). Tudíž neovulují a k výtěru nedojde (Angulleiro a kol., 2006; Barbaro a kol., 2002). Důvodem

je, že na konci vitelogeneze nedochází ke krátkodobému zvýšení sekrece LH z hypofýzy (Mylonas a Zohar, 2001). Problém se nenachází v syntéze LH, ale v jeho chybějící sekreci. Což bylo prokázáno porovnáním množství LH a jeho mRNA v hypofýze u v zajetí držených a volně žijících ryb (Steven, 2000; Steven a kol., 2000). U mlíčáků můžeme pozorovat sníženou tvorbu mlíčí či jeho nízkou kvalitu (Abraham, 1988).

2.2.4 Náprava reprodukčních dysfunkcí

2.2.4.1 Preparáty na bázi gonadotropinů

Při nedostatečné tvorbě endogenního LH je zapotřebí aplikovat exogenní LH (kapří hypofýza) prostřednictvím preparátů na bázi gonadotropinů nebo chemickým složením LH podobným choriogonadotropinem (Levavi-Zermonsky a Yaron, 1986).

2.2.4.1.1 Kapří hypofýza

Nejběžnějším preparátem používaným ke stimulaci ovulace ryb byla a stále je kapří hypofýza. Pro nápravu reprodukčních dysfunkcí jsou nejúčinnější rybí hypofýzy, které jsou shromážděné během období tření. Pravděpodobně je to zapříčiněné zvýšenou akumulací LH v hypofýze. Odebírají se z pohlavně zralých ryb, nezávisle na jejich pohlaví (Zohar, 1989). Množství LH v hypofýze se odvíjí od pohlaví, hmotnosti, věku, ročního období a doby skladování dané hypofýzy (Yaron, 1995).

S aplikací hypofýzy jsou spojeny různé nevýhody (Zohar a Mylonas, 2001) :

1. Použitím hypofýzy dochází k podání dalších hormonů, které se v ní nachází. Ty mohou dále negativně ovlivnit fyziologii ošetřených ryb.
2. Koncentrace LH v hypofýze je vysoce variabilní.
3. Riziko přenosu nemocí na ošetřené ryby.
4. Potenciální možnost zánětlivé reakce způsobené tkáněmi hypofýzy.

2.2.4.1.2 Choriogonadotropin (hCG)

Další variantou přípravků na bázi gonadotropinů jsou preparáty obsahující lidský choriový gonadotropin – hCG (Donaldson, 1996), který je získáván z moči těhotných žen (Katzman a Doisy, 1932). HCG je u ryb aplikován v jednom či vícenásobném ošetření o celkové dávce 500 – 4000 MJ.kg⁻¹ (Ohta a Tanaka, 1997). Podobně jako je tomu u jiných hormonálních terapií je i zde pro indukci spermiace samců dostačující dva až čtyřikrát nižší dávka hCG (Tamaru a kol., 1996; Wantanabe a kol., 1998). Stejně jako kapří hypofýza i přípravky s obsahem hCG mají své nevýhody. Tou největší je cena, za kterou se pořizují (Mylonas a Zohar, 2001; Rainis a Ballestrazzi, 2005). Další nevýhodou je zjištění, že se v dalších výtěrových obdobích u již dříve injikovaných ryb projevovala snížená schopnost stimulovat ovulaci pomocí hCG (Van der Kraak a kol., 1989; Wantanabe a kol., 1998).

2.2.4.2 Faktory hypotalamu

GnRH

Koncem 20. století (Matsuo a kol., 1971) došlo k převratnému objevu GnRH, jež otevřel dveře zcela novému způsobu léčby reprodukčních dysfunkcí u ryb, vznikl tzv. hypotalamický přístup (Zohar, 1988). Tento nový postup doplnil doposud používanou hormonální terapii o možnost přímé stimulace gonadotropních buněk, uvolňující rybímu organismu vlastní LH (Zohar a Mylonas, 2001). Pozice GnRH v hormonální kaskádě umožňuje komplexnější nápravu reprodukčních dysfunkcí a to v podobě nejen stimulace sekrece LH (Yaron a Sivan, 2006), ale i sekrece spolupůsobících faktorů, kterými jsou například thyroïdní hormony (Le Gac a kol., 1993), růstové hormony, atp. (Cyr a Eales, 1996). Během prvotních experimentů za použití přírodních GnRH peptidů indukující ovulaci bylo charakteristické použití vysokých dávek GnRH, avšak míra úspěšné ovulace byla relativně nízká (Kouřil a Barth, 1981). Přírodní GnRH totiž není schopen odolat enzymatické degradaci způsobenou proteázami lokalizovanými v hypofýze, játrech a ledvinách (Zohar a kol., 1990). Účinek neurodecapeptidu GnRH byl několikanásobně zvýšen syntézou GnRH analogů (GnRHa), které jsou odolnější vůči enzymatickému štěpení endopeptidázami (Zohar, 1990). Výhodou chemické syntézy je umožnění použití přesné dávky GnRH a také eliminace rizika přenosu infekčních onemocnění (Chen a Fernald, 2008). Dalším pozitivním faktorem je vysoký stupeň

podobnosti GnRH peptidů mezi různými druhy, což umožňuje použití jednoho přípravku pro více druhů ryb (Podhorec a Kouřil, 2009). Synteticky vytvořené GnRH se od sebe odlišují spektrem aminokyselin, které udává jejich účinnost (Formies a kol., 2003). Kromě samotného typu GnRHa je důležitým faktorem i způsob jeho aplikace, jež je podmíněn způsobem rozvíjení gonád (Mylonas a Zohar, 2007). Druhům ryb se synchronním rozvojem gonád většinou postačuje jednorázové injekční podání (Yaron, 1995). Oproti tomu druhům s asynchronním dozráváním gonád je vhodnější aplikovat dlouhodobě se uvolňující přípravky GnRHa (Mylonas a Zohar, 2001).

Dopamin

Z důvodu účinku dopaminu se využívají antagonisté dopaminu v kombinaci s GnRHa k minimalizaci reprodukčních dysfunkcí zejména u druhů ryb, které se vyznačují silnou odezvou dopaminu na inhibici LH sekrece (Peter a kol., 1993). DA se projevuje narušením syntézy a sekrece GnRH a zároveň již zmíněnou inhibicí uvolňování LH z hypofýzy (Chang a kol., 1984). Kombinované podání GnRHa a antagonistů dopaminu (např. domperidone, metoclopramid, pimozide) se k vyvolání ovulace podává v jedné nebo ve dvou dávkách. Toto podání zcela odstraňuje inhibici sekrece gonadotropních hormonů a zároveň dochází ke zvýšení stimulačního účinku GnRHa (Trudeau a Peter, 1995).

2.2.4.3 Poloumělý výtěr

Tato metoda byla používána před zavedením umělého výtěru. Štíky byly umístěny do zatravněných manipulačních nebo Dubraviových rybníků či sádek vybavených hnízdy pro kladení jiker. Hnízdo bylo tvořeno svazkem větví jehličnanů (Mareš a Burleová, 1983). Do připravených nádrží s teplotou vody 7 – 12 °C byly vysazovány štíky v optimální době zralosti. Generační štíky se získávaly přímo na trdlištích odlovem pomocí prubního plotu. Nasazování se odvíjí od velikosti třetího rybníku (Füllner a kol., 2007). Kostomarov (1958) uvádí, že na 1000 m² manipulačního rybníku se nasazují 2 jikernačky a 6 mlíčáků. Naopak Füllner a kol. (2007) doporučují nasazovat na 500 m² dokonce až 100kg generačních štik. Poměr pohlaví by se měl pohybovat kolem 1 : 2 – 3 ve prospěch mlíčáků. Bezprostředně po výtěru se generační ryby odloví. Doba inkubace jiker a rozplavání plůdku závisí na teplotě, obvykle probíhá 4 týdny.

Plůdek se poté odloví nebo se přikrmuje po dobu 10 – 14 dní zooplanktonem až do velikosti těla kolem 3 cm. Poté je potřeba štiky odlovit, abychom předešli ztrátám kvůli jejich kanibalizmu (Dubský a kol., 1998).

2.2.4.4 Umělý výtěr

Nejdůležitější částí tohoto způsobu výtěru je jeho příprava. Prvním úkolem je dostatek generačních ryb připravených k výtěru, tedy ovulujících jikernaček a pohlavně zralých mlíčáků. V minulosti se generační štiky získávaly z volných vod přímo z trdlišť, kde se nacházely štiky v ideálním stádiu zralosti a byly připravené k výtěru. Výtěr mohl probíhat již v terénu na dané lokalitě či po převozu do líhně. V současné době je tento způsob získávání generačních ryb nemožný z důvodu zregulovaného režimu vody v krajině. Nyní jsou hlavním poskytovatelem generačních ryb jarní výlovy rybníků, kam jsou po podzimních výloveh cíleně vysazovány remontní jedinci štik. Nevýhodou je ovšem fakt, že rybníky jsou na jaře loveny za jiným účelem než právě tření štik. Proto se následně často setkáváme s nízkým počtem ovulujících jikernaček nebo naopak s přezrálými jikernačkami či dokonce s již vytřenými štikami. Štiky, které jsou připravené, putují do líhně a ty, které na svou chvíli zatím čekají, jsou umístěny do zatravněných manipulačních rybníčků (Hartman a Regenda, 2014). Nejvhodnější způsob pro získání generačních ryb je odchyt prubním plotem na komorových rybnících, na kterých byla na vhodných místech cíleně vytvořena improvizovaná trdlišť. Při odchytu se od sebe oddělují mlíčáci a jikernačky. Část mlíčáků je převezena do líhně, kde jsou umístěni do žlabů. Tím se snažíme předejít spontánnímu výtěru. Odchyt jikernaček provádíme opakovaně. Důležitá je častá kontrola trdlišť. Jikernačky poté nesádkujeme příliš dlouho, abychom zabránili degeneraci pohlavních produktů (Mareš a Burleová, 1983). Z jedné tuny generačních štik je možné získat až 10 mil. oplozených jiker. Pro snadnější manipulaci se štikami na líhni, obzvláště s těmi většími, je vhodné provádět jejich anestezii (viz příloha č.1) (Čítek a kol., 1988). U štik se osvědčil hřebíčkový olej (4 ml na 100 l vody) (Randák a kol., 2013). Pro oplozování jiker štiky je nejvhodnější teplota 8 – 10 °C, pH 6 – 8 (Čítek a kol., 1998). Sperma mlíčáků štik odebíráme po osušení močopohlavního otvoru a odstříknutí moči do injekčních stříkaček (viz příloha č.2). Při tomto procesu musíme dbát na to, aby nedošlo k jeho předčasné aktivaci močí. Odebrané mlíčí použijeme co nejdříve. V případě nedostatku spermatu je možné přistoupit k zabíjení mlíčáků a vypreparování jejich varlat, které se

rozstříhají na malé kousky a přes suchý uhelón se extrahuje testikulární sperma přímo na jikry (viz příloha č.3) (Linhart a Pokorný, 1984). Čistá vypreparovaná varlata je možné skladovat při teplotě + 2 °C až 48 hodin. Mlíčí bývá bílé barvy. Na začátku výtěrového období má smetanovou konzistenci, která postupně řídne až do mléčné (vodové) konzistence. K jeho produkci může docházet již v lednu. Uvolňuje se však postupně, a tak je možné mlíčáky používat opakovaně (Baruš a Oliva, 1995a). Mlíčáci uvolní vždy jen malé množství mlíčí v rozmezí 0,1 – 1,2 ml. Zpravidla však jen 0,3 – 0,5 ml. S navyšující hmotností jedince se úměrně nezvyšuje množství jednorázového odběru spermatu. Proto k umělému výtěru plně postačují jedinci o hmotnosti 0,7 – 1,5 kg (Linhart, 1985). Sperma štik je velmi pohyblivé. Koncentrace spermií v něm dosahuje 10 – 30 mil. ks.mm⁻³, v průměru 18,5 mil. ks.mm⁻³. Počet spermií v ejakulátu je dle pozorování Krupauer a Pekař, (1965) vyrovnaný. Po aktivaci vodou jsou pohyblivé po dobu 1 – 2 minut (Linhart a Pokorný, 1984; Čítek a kol., 1998). Na oplodnění jednoho litru/kilogramu jiker je zapotřebí alespoň 2 – 3 ml mlíčí, minimálně od 3 mlíčáků. Pokud máme dostatek mlíčí, aplikujeme ho co nejvíce a od co největšího počtu mlíčáků. Štice důkladně usušíme břišní partie, ústí močopohlavní papily a řitní ploutev. Zafixujeme hlavu a ocas a pozvolným tlačáním od hrdla k močopohlavní papile vytíráme štiky do lavoru či misky (viz příloha č.4). Zamezujeme jakémukoli kontaktu jiker s vodou. Pro zajištění maximální oplozenosti je vhodné na misku dávat maximálně jeden litr/kilogram jiker. Na jikry aplikujeme mlíčí. Důkladně a velmi jemně je promícháme. Ideální je po promíchání nechat gamety na 30 – 60 minut odstát, aby se lépe dokončily meiotické pochody a zvýšila se tak oplozenou jiker (Hartman a Regenda, 2014). Linhart (1985) říká, že nejlepší oplozenosti jiker (70 – 80 %) dosáhneme při použití oplozovacího roztoku. Ve srovnání s vodou je tento způsob efektivnější o 20 – 40%. Doporučuje Hamorův nebo Ringerův oplozovací roztok. Pokud oplozovací roztok nemáme, použijeme vodu z líhně (1 litr vody na 1 litr.kg⁻¹ jiker). Vodou či roztokem aktivované gamety jsou v misce jemně promíchány a ponechány v klidu. Doba oplozování se pohybuje v rozmezí 5 – 10 minut. V jejím průběhu občas krátce promícháme (viz příloha č.5) (Linhart, 1985). Další důležitou fází je proces odlepkování jiker. Ty se totiž po 4 – 5 minutách stávají lepkavými. K jejich odlepkování je obvykle stačí opakovaně promýt a zajistit vyšší průtok vody v inkubační láhvi na začátku inkubace. V případě potřeby můžou být jikry odlepkovány emulzí talku/mastku (100g na 10 l vody + 20 g NaCl), mlékem (1:5 – 10), škrobem (5 % roztok z prášku) či emulzí

jílu po dobu 30 – 40 minut (viz příloha č.6) (Berka a Hamáčková, 1980). Jikry mají bledožlutou barvu. Počet jiker (absolutní plodnost) značně kolísá, ale má tendenci narůstat s vyšší hmotností a velikostí jikernaček (Toner a Lawler, 1969). Velikost jiker získaných od různě velkých štik z různého prostředí se pohybovala v rozmezí od 2,3 do 3 mm. Lahnstainer a kol, (1998) uvádí, že v 500 ml je zhruba 75000 jiker. Podle Lindrotha, (1947) se mikropyle uzavírá do 0,5-1 minuty od aktivace.

K samotné inkubaci se používají Chasseovy, Zugské (Weisovy) nebo Kannengieterovy lahve. Do inkubační láhve o objemu 7 až 10 litrů je vhodné umístit ne více než 3 litry nenabobtnaných jiker. Jikry by měly dosahovat maximálně do dvou třetin výšky inkubační láhve (Čítek a kol., 1998). Nezbytně důležitá je častá kontrola inkubace. Spleené shluky jiker je potřeba rozmíchávat pomocí husího brku. Proud vody nesmí být příliš vysoký. Předcházíme „vystřelování“ jiker, jelikož jsou citlivé vůči nárazům.

2.2.4.4.1 **Hormonální stimulace**

Hormonální stimulace se u mlíčáků ani jikernaček štiky zpravidla neprovádí. Pokud je to však potřebné, je možné vyvolat ovulaci jikernaček aplikací kapří hypofýzy ve dvou dávkách. První, startovací dávka je 0,5 – 0,7 mg/kg hypofýzy, po 24 hodinách se aplikuje druhá, hlavní dávka 4 – 5 mg/kg hypofýzy. Aplikace se provádí intramuskulárně (viz příloha č.7) do hřbetní svaloviny nebo intraperitoneálně skrz jamku pod pletencem břišní ploutve. Pecha a kol. (1992) říká, že klasickou technikou aplikace dehydrovaných hypofýz je jejich homogenizace nejčastěji v 0,7–0,9% fyziologickém roztoku (NaCl) a intramuskulární či intraperitoneální jednorázová aplikace v dávce 3–4 mg.kg⁻¹ živé hmotnosti jikernaček. V případě nedostatku mlíčáků je možné zvýšit produkci spermatu aplikací kapří hypofýzy. Jednorázová dávka hypofýzy pro mlíčáky dosahuje 3-4 (8) mg.kg⁻¹. K odběru spermatu přistupujeme po 24 až 48 hodinách. Použít se dají také syntetické přípravky Ovopel, Ovaprim nebo Dagin (Randák a kol., 2013). Proto je na místě vytvořit nový typ hormonálního ošetření na bázi GnRH, který by byl efektivní a bylo možné ho využít v praxi.

2.2.5 Inkubace a kulení váčkového plůdku

Inkubace jiker probíhá v již zmíněných Chasseových (viz příloha č.8) nebo Zugských láhvích při teplotě vody 8 – 12 °C. Chladnější voda jikrám neprospívá, inkubační doba se prodlužuje a vede ke zvýšeným ztrátám. Ztráty při líhnutí jiker po umělém výtěru štiky bývají kolem 25% (Šimek, 1954). Vyšší teplota vody a přísun světla urychluje vývoj jiker a zhoršuje kvalitu vykuleného plůdku (Füllner a kol., 2007). Po umístění jiker do inkubačních láhví se průtok vody zvýší, aby docházelo k lepšímu oddělování slepených jiker a rychlejšímu odplavení zbytků odlepkovacího roztoku. Po pročištění se průtok vody upraví tak, aby se jikry v láhvi pohybovaly jen mírně - „překulovaly se“. Snažíme se zamezit prudkým nárazům nebo „vystřelování“, jelikož jsou citlivé na otřesy. První manipulace je možná až během stádia očních bodů, které nastává v 70 °d, tedy přibližně po polovině inkubační doby, která trvá 110 – 130 °d. Inkubační láhve jsou skvělé pro neustálý přísun čisté okysličené vody a zároveň tento proud odděluje mrtvé a živé jikry, jelikož mrtvé se z důvodu nižší specifické hmotnosti a síle proudu drží na hladině. Od objevení se očních bodů můžeme jikry převážet či umisťovat do horizontálních inkubačních aparátů k dolíhnutí. Nejpozději tak učiníme po objevení se prvních vykulených štiček. Nejpoužívanějšími jsou u nás Rückel – Vackovy aparáty nastavené na spodní tok s inkubačními vložkami umístěnými v nízkých odkulovacích žlabech (viz příloha č.9). Během celé inkubace se staráme o maximální komfort jiker. Pravidelně odsáváme jikrné obaly, mrtvé jikry a jiné nánosy na dně. Po vykulení mají štičky na hlavičce lepkavou papilu, pomocí které se přichytávají „zavěšují“ na vhodný substrát. Proto do inkubačních vložek umisťujeme jemně perforované plechové přepážky. Po 3-6 dnech se prolamují ústa. Resorpce žloutkového váčku trvá s ohledem na teplotu vody 5-10 dní. Poté se plůdek pouští a nadechuje. Tuto fázi označujeme jako „rozplavání“ (viz příloha č.10 a č.11). Vysazování je možné po rozplavání minimálně poloviny plůdku (Baruš a Oliva, 1995a).

3 MATERIÁL A METODIKA

3.1 Chovné podmínky

22. března 2019 započal v areálu tábořské firmy Štičí líheň ESOX s.r.o. experiment s jikernačkami štiky obecné. K dispozici bylo 50ks ryb, ani jedna se nenacházela ve stádiu ovulace. Ryby byly drženy v průtočných laminátových žlabech, napájeny vodou z nádrže Jordán. Byly ponechány venku bez zastřešení na přírodním světelném režimu. Do žlabů nebyl přidán třecí substrát. Během celého odchovu ryby nebyly krmeny. Úniku štik zabráňovala ochranná síť a snížená hladina vody. Utvořily jsme 5 skupin po 10 kusech jikernaček. Teplota vody byla $6,06 \pm 0,3$ °C a nasycení vody kyslíkem $6,0 \pm 0,7$ mg.l⁻¹. Během experimentu nedocházelo k odběrům krve. Současně probíhal stejný experiment v Mydlovarské líhni firmy BaHa s.r.o. Odchovné prostory této líhně jsou, oproti tábořské, zastřešené a ryby byly ponechány na průtočných závěsných žlabech bez výtěrového substrátu a krmných ryb. Rovněž jsme pracovali s 5 skupinami po 10 kusech jikernaček. Teplota vody byla $8,5 \pm 0,5$ °C a nasycení vody kyslíkem $6,5 \pm 0,4$ mg.l⁻¹. Během tohoto experimentu docházelo k odběrům krve a štiky tím byly vystaveny většímu stresu než štiky v Táboře. Výsledky jsou vztažené pouze pro jikernačky z Táboře z důvodu nižšího zatížení stresem a více připomínající provozní podmínky.

V druhém dubnovém týdnu roku 2018 proběhl také experiment s mlíčáky. Ti byli rozděleni do 4 skupin po 10 kusech. Tentokrát již byly ryby pod střechou ve žlabech situovaných v prostorách Experimentálního rybochovného pracoviště, FROV JČU ve Vodňanech. Nádrže byly napojeny na průtočný systém, zajišťující nepřetržitý přísun čisté vody o teplotě $8,0 \pm 0,6$ °C a nasycení vody kyslíkem $6,5 \pm 0,5$ mg.l⁻¹.

3.2 Experimentální ryby

K experimentu s jikernačkami bylo k dispozici 100 kusů jikernaček, jejichž průměrná hmotnost byla $1,3 \pm 0,5$ kg. Ryby byly stejného původu (táborské rybníky firmy Štičí Líheň ESOX s.r.o.) a rozděleny byly tak, aby byly v každé skupině zastoupeny všechny hmotnostní kategorie (0,5 – 5kg). Díky tomu byly všechny skupiny hmotnostně vyrovnané. Mlíčáků bylo celkově 40ks. Dosahovali menší hmotnosti než jikernačky, průměrně $1,25 \pm 0,5$ kg a pocházeli z Rybářství Hluboká s.r.o.

3.2.1 Umělý výtěr

Všechny výtěry prvního experimentu s jikernačkami proběhly v prvním dubnovém týdnu roku 2018. Výtěry druhého experimentu pak probíhaly na přelomu března a dubna roku 2019. Štíky se pravidelně kontrolovaly a v případě uvolňování jiker došlo k okamžitému výtěru, následnému oplození a inkubaci jiker. Jikernačky byly ponechány v předvýtěrovém období v sádce bez výtěrového substrátu, který by mohl ryby stimulovat a urychlit dozrávání oocytů. Než došlo k samotné injikaci, opatrně jsme slovíli celou sádku, ovulující jedince jsme vyřadili a zbytek jsme náhodně rozdělili do skupin. Posléze individuálně zvážili a dle hmotnosti patřičně injikovali připraveným preparátem (viz příloha č.12). Stejný postup jsme aplikovali i u mlíčáků, kteří byli injikováni intramuskulárně do hřbetní svaloviny, zatímco jikernačky byly injikovány intraperitoneálně skrz jamku pod pletencem břišní ploutve. Injikace hormonálních přípravků probíhaly v ranních hodinách, vždy mezi 8 a 9 hodinou. Mlíčí jsme odebírali do injekčních stříkaček s imobilizačním roztokem a poté skladovali na ledu. Následoval převoz a podrobení testům. V pravidelných intervalech probíhal odběr krve. K výtěru docházelo pouze v případě, pokud jikernačka pouštěla jikry po vyvinutí mírného tlaku na oblast před močopohlavní papilou. Jakmile se ryby nacházely v tomto stádiu zralosti, byly opět zváženy a vytřeny tzv. suchou metodou. Název napovídá, že se gamety během výtěru nesmí dostat do kontaktu s vodou (viz příloha č.13). Nejprve je zapotřebí důkladně otřít břišní partie i ploutve, abychom předešli aktivaci gamet v oblasti močopohlavního otvoru či v samotné misce. Vytíráme tedy do zcela suchého latoru nebo misky, přičemž dbáme na to, aby se jikry během pádu nepoškodily. Mezitím si odebereme mlíčí pomocí jednorázových injekčních stříkaček s imobilizačním roztokem (my používali testikulární sperma). Štíky mají močový měchýř a často dochází ke

kontaminaci močí. V případě velkého množství jiker můžeme přistoupit k zabítí mlíčáků a použití testikulárního spermatu proceděním přes suchý uhelón. Je lepší použít sperma vícero mlíčáků, pro případ nízké kvality gamet některého z nich. Dále jsou jikry pomocí mlíčí osemeněny, po opatrném přilítí vody či oplozovacího roztoku a následném promíchání oplozeny. Dále následuje proces odlepkování jiker a samotná inkubace. V našem případě probíhala inkubace v plastovém vzorkovacím inkubátoru s perforovanými stěnami (viz příloha č.14). Průměrné množství nasazených jiker v inkubátoru bylo 100ks a inkubace probíhala ve 3 opakováních. Následovala analýza pohlavních hormonů a kvality pohlavních produktů.

3.3 Použité chemické přípravky

Mikročástice z kopolymerů kyseliny mléčné a kyseliny glykolové (PLGA)

Jedná se o biodegradabilní a biokompatibilní mikročástice, umožňující kontinuální a kontrolované uvolňování hydrofobní látky (v našem případě hormonů). Mikročástice jsou v současné době intenzivně studovaným a perspektivním typem lékové formy. Jsou definovány jako pevné částice přibližně kulovitého tvaru s velikostí v řádech jednotek až stovek μm . Částice s podobnou charakteristikou menší než $1 \mu\text{m}$ se nazývají nanočástice. Částice větší než mikročástice jsou pelety, jejichž velikost se pohybuje nejčastěji mezi 0,5–2 mm. Hranice tohoto rozdělení však nejsou ostré. Mikročástice lze rozdělit na mikrotobolky (složené z jádra v pevné, kapalné či plynné podobě, na které těsně přiléhá polymerní obal) a mikrosféry (nerozlišujeme u nich jádro a obal, léčivo je rozptýleno v matrici mikrosféry v pevné formě nebo je přítomné ve formě suspenze či emulze). Ve farmacii se mikročástice používají k maskování chuti léčiv, k ochraně léčiva před nežádoucími vlivy okolního prostředí či zapracování těkavých léčiv, např. silic. Nejcennější vlastností je pak možnost řízeného uvolňování léčiva. V současné farmakoterapii lze stále nalézt velké množství léků první generace, ze kterých se léčivo uvolňuje kinetikou prvního řádu. Po podání dosáhne koncentrace léčiva v plazmě svého maxima a poté klesá. K udržení terapeutické hladiny léčiva je proto zapotřebí opakovaného dávkování, jinak hrozí pokles plazmatické koncentrace léčiva pod terapeutickou hladinu. Úkolem moderní farmaceutické technologie je v současnosti vývoj a výroba takových lékových forem, které zajistí uvolňování léčiv v požadované dávce a po stanovený čas. Díky tomu je možné udržet požadovanou terapeutickou

hladinu léčiva v krevní plazmě. Zvyšuje se tak účinnost léčiva, snižuje se výskyt nežádoucích účinků a celková dávka léčiva potřebná k terapii je menší (Vysloužil a kol., 2013).

Pomocí GnRHa navázaného na mikročástici PLGA jsme schopni po dobu 1 týdne kontrolovaně a kontinuálně provádět hormonální stimulaci. Plazmatická koncentrace GnRHa se díky tomuto typu ošetření drží ve stejné hladině a není proto potřeba s rybou manipulovat, injikovat ji a vystavovat ji stresu opakovaně.

mGnRHa

Gonadotropin uvolňující hormon je chemickou strukturou neurodecapeptid hypotalamického původu a je hlavním regulátorem sekrece LH. Použitý savčí analog mGnRHa (pGlu – His – Trp – Ser – Tyr – D-Ala – Leu – Arg – Pro-NH₂) byl: A) navázan na mikročástice v dávce 1,6 µg mGnRHa na 1 mg⁻¹ PLGA mikročástic nebo B) rozpuštěný ve fyziologickém roztoku (0,9 % NaCl) na požadovanou koncentraci (20 či 40 µg.ml⁻¹). Výrobce je společnost Bachem (Švýcarsko).

Metoclopramide

Jedná se o tuhý a ve vodě rozpustný antagonistu dopaminu, který je běžně využívaný ve farmacii k tlumení nevolnosti a zvracení. V našem případě jsme ho použili pro zesílení působení GnRHa. Před samotnou aplikací bylo nejdříve potřeba metoclopramide rozpustit ve fyziologickém roztoku a smísit s roztokem mGnRHa o požadované koncentraci. Metoclopramide byl u vybraných skupin dávkován celkem třikrát v dávce 20 mg.kg⁻¹. Výrobce je společnost Sigma, Darmstadt (Německo).

Kapří hypofýza (CPE)

Jedná se o nejčastěji používaný preparát pro umělý výtěr ryb. Významné jsou výhradně v ní obsažené gonadotropní hormony, které stimulují nástup ovulace a spermiace. Roztok sušené hypofýzy a fyziologického roztoku se aplikuje intramuskulárně do hřbetní svaloviny nebo do břišní dutiny, intraperitoneálně (v našem

případě oba způsoby, kdy mlíčáci byli injikováni intramuskulárně, zatímco jikernačky intraperitoneálně). Kapří hypofýza pocházela z Klatovského rybářství a.s.

Fyziologický roztok

Jedná se o 0,9% sterilní roztok chloridu sodného, který jsme používali pro přípravu a následnou aplikaci hormonálních preparátů. Námí používaný fyziologický roztok pocházel z Itálie od společnosti Fresenius Kabi.

Heparin

Chemickou strukturou se jedná o kyselý mukopolysacharid, jehož účinkem je snížení sražlivosti krve. Aplikovali jsme ho do injekčních stříkaček před odběrem krve, abychom zabránili jejímu sražení v jehle či samotné stříkačce. Výrobce Zentiva a.s.

Hřebíčkový olej

Pro snadnější manipulaci jsme ryby podrobili anestezii. Hřebíčkový olej jsme používali v koncentraci 0,04 ml.l⁻¹. Do České republiky ho dodává firma RNDr. Jan Kulich s.r.o. Anestetikum je dostupné v lékárenské síti.

Jodisol

Jodisol je vysoce účinný dezinfekční přípravek. Jedná se o tříprocentní lihový roztok komplexní sloučeniny (jodofor) s možností širokého použití. Má velký rozsah účinku na množící se formy mikroorganismů t.j.bakterie, plísně i na viry. Používali jsme jej na ošetření místa odběru krve (vpichu) a drobných oděrek na těle. Výrobce je společnost SpofaDental a.s, Jičín.

Hormonální přípravky byly injikovány následovně:

Mlčáci 2018

Tab.č.1: Injikace mlíčáků.

Skupina	Použitý hormonální preparát	Dávka
A	0,9 % NaCl	1 ml.kg ⁻¹
B	Kapří hypofýza	2 mg.kg ⁻¹
C	PLGA; uvolňování 4 dny	20μg GnRHa.kg ⁻¹
D	PLGA+MET; uvolňování 4 dny	20μg GnRHa.kg ⁻¹ + 20 mg.kg ⁻¹

Jikernačky 2019

Tab.č.2: Injikace jikernaček

Skupina	Použitý hormonální preparát	Dávka
A	0,9 % NaCl	1 ml.kg ⁻¹
B	Kapří hypofýza	4 mg.kg ⁻¹
C	PLGA; uvolňování 7 dní	40μg GnRHa.kg ⁻¹
D	PLGA+MET; uvolňování 7 dní	20μg GnRHa.kg ⁻¹ + 20 mg.kg ⁻¹
E	PLGA+MET; uvolňování 7 dní	40μg GnRHa.kg ⁻¹ + 20 mg.kg ⁻¹

3.4 Vyhodnocení získaných výsledků

3.4.1 Analýza koncentrace hormonů

Vykonány byly rozbory krevní plasmy u mlíčáků, kde jsme zjišťovali koncentraci pohlavního steroidu 11keto-testosteronu pomocí komerčně dostupného ELISA (EIA) kitu. Dodavatelem kitů byla společnost Cayman Chemicals, USA. Nejprve jsme odebrali pomocí injekčních stříkaček 1 ml krve z ocasního násadce a rozdělili po 1 ml do vzorkovnic Ependorf. Z každé ryby jsme tedy měli 2 x 1 ml krve. Vzorkovnice jsme vložili do centrifugy (Vibramax 110, Heidolph, Germany), kde probíhalo odstředování po dobu 10 minut při 4 000 ot.min⁻¹. Krevní plasma pak byla pomocí pipety přendána do jiné vzorkovnice. Následně byla zmrazena při – 20 °C a podrobena testům na koncentraci pohlavních hormonů.

3.4.2 Analýza mlíčí

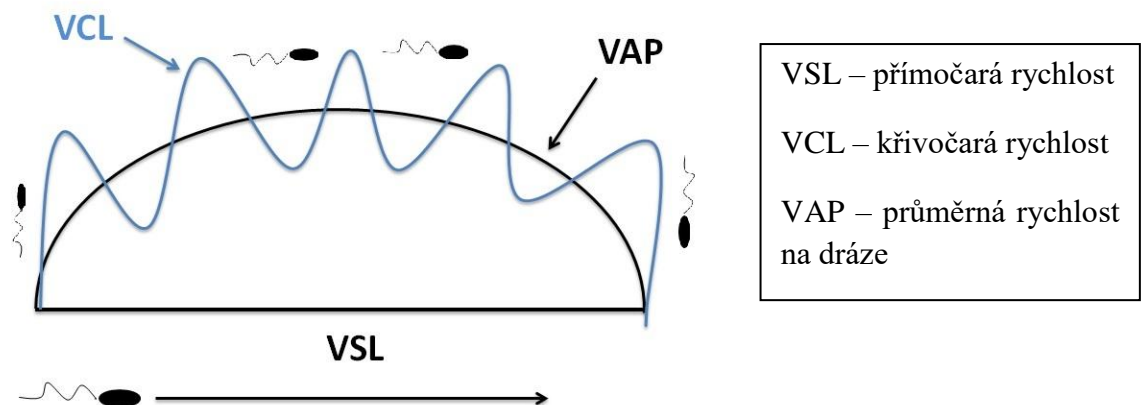
U mlíčáků jsme sledovali pohyblivost spermií, délku a rychlost pohybu (zkoumané parametry viz obr. č.3, upraveno podle Baiee et al., 2017) a množství mlíčí. Po aktivaci spermií v roztoku Tris pufru pH 8,4 (10 mM Tris (hydroxymethyl) aminomethan, Sigma-Aldrich) doplněném 0,25% Pluronic F-127 (Sigma-Aldrich) byla hodnocena motilita spermií. Vzorek spermií byl naředěn v poměru cca 1: 1000 s 40 µl aktivačního média přímo pod mikroskopem (pomocí špičky injekční jehly byly přidány spermie pro získání 50-150 buněk v pozorovacím poli) na krycím sklíčku ochlazeném na 11° C s termostatem (CEMIK , Polsko). Záznam byl spuštěn ihned po aktivaci a proveden po dobu 1 minuty při 25 snímcích / s pomocí světelného mikroskopu vybaveného digitálním fotoaparátem (PROiSER, Španělsko). Byl použit negativní fázový kontrast a čočka s 10 násobným zvětšením. Video záznamy byly analyzovány za účelem stanovení průměrné rychlosti spermií (VAP) a procenta pohyblivých buněk (míra motility) pomocí softwaru ImageJ (National Institutes of Health, USA) a CASA pluginu (Wilson-Leedy a Ingermann, 2007; Buy a Earle, 2012). Data jednotlivých skupin jsou od sebe odděleny podle času odběru. Koncentrace spermatozoí byla stanovena pomocí Bürkerovy komůrky. Spermie byly zředěny ve dvou krocích 10 000 krát ve fyziologickém roztoku a po 5 minutách byly umístěny do komůrky, kde byl proveden výpočet. Každý vzorek byl spočítán trojmo.

3.4.3 Analýza výtěrových parametrů

U jikernaček jsme zjistili, procento ovulujících jikernaček, oplozenost jiker a líhivost larev počítáním oplozených jiker a následně počtem larev v inkubátorech pomocí softwaru ImageJ (National Institutes of Health, USA), délku časového intervalu od injekce do výtěru jikernaček (doba latence), absolutní a relativní plodnost

3.4.4 Statistické vyhodnocení výsledků

Signifikantní rozdíly mezi jednotlivými skupinami v době odběru jsou označeny malými písmeny (jednocestná ANOVA). Signifikantní rozdíly uvnitř jedné skupiny za dobu trvání experimentu jsou označeny velkými písmeny (jednocestná ANOVA, Tukey HSD pro nestejný počet subjektů ve skupinách) ($p < 0,05$).



Obr. č.3: Pohybové parametry spermie

4 VÝSLEDKY

4.1 Experiment – Mlíčáci 2018

Objem mlíčí se po aplikaci námi vybraných hormonálních přípravků zvýšil u všech skupin. Signifikantní rozdíly jsou viditelné již při porovnání počátečního odběru s odběrem po 48 hodinách. Aplikace kapří hypofýzy (CPE, $2\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) měla za následek zvýšení objemu mlíčí z původních 900 ± 400 ml na 2200 ± 300 ml (průměr \pm SD), tato hodnota byla naměřena i po 96 hodinách. Použitím PLGA ($20\mu\text{g GnRHa}\cdot\text{kg}^{-1}$) se objem mlíčí zvýšil ze 750 ± 300 ml na 1250 ± 200 ml. Rozdíly mezi skupinami daného odběru nebyly statisticky významné. (viz graf č.1).

Na koncentraci spermií neměla aplikace hormonálních preparátů významný vliv. Rozdíl jsme zaznamenali u kontroly, kde došlo mezi prvním a druhým odběrem ke zvýšení koncentrace spermií ze $16 \pm 1,74$ na $20,5 \pm 3,3 \times 10^9 \cdot \text{ml}^{-1}$ a poté u skupiny PLGA($20\mu\text{g GnRHa}\cdot\text{kg}^{-1}$), kde došlo ke snížení koncentrace spermií mezi druhým a třetím odběrem ze $23,95 \pm 3,57$ na $18,06 \pm 4,4$. Nutno říci, že počáteční průměrná koncentrace spermií byla u skupin rozdílná. Pravděpodobně kvůli výjimkám mezi mlíčáky, kteří měli výjimečně husté či naopak řídké mlíčí (viz graf č.2).

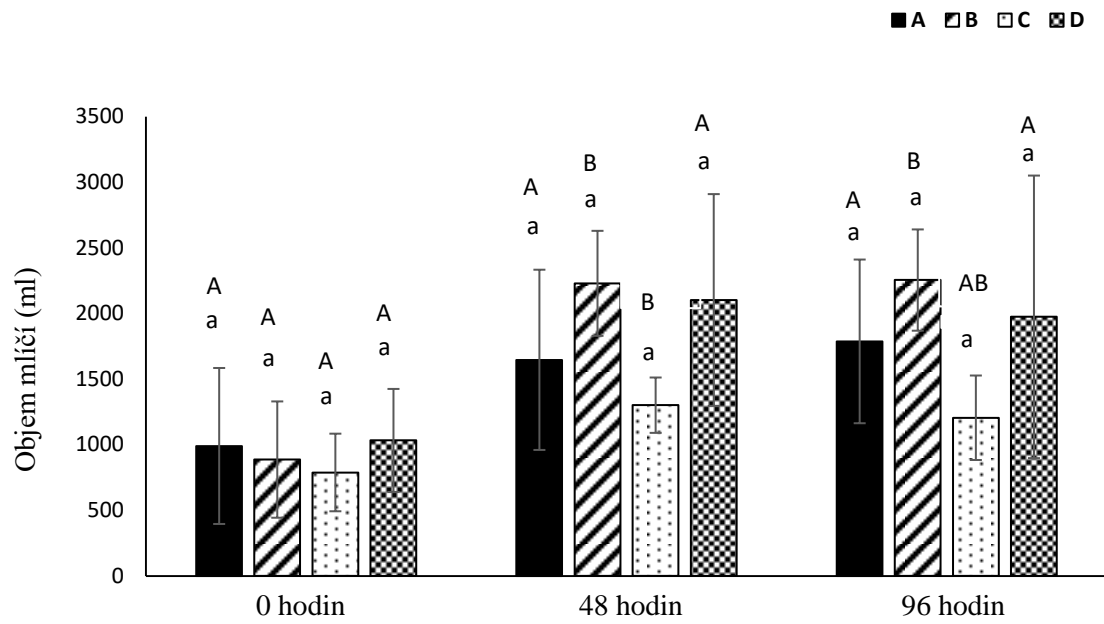
Aplikace hormonálních preparátů ukazuje pozitivní vliv na pohyblivost spermií. Signifikantní rozdíly jsme zaznamenali rovněž po 48 hodinách po aplikaci CPE ($2\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) a PLGA ($20\mu\text{g GnRHa}\cdot\text{kg}^{-1}$), kdy se pohyblivost zvýšila z 68 ± 15 % na 88 ± 5 % u CPE a z 80 ± 15 % na 95 % u PLGA. Tyto skupiny byly signifikantně rozdílné i v rámci daného odběru. Pohyblivost spermií mlíčáků injikovaných CPE se po 96 hodinách zvýšila na 90 ± 5 %, avšak nebyla statisticky významná od ostatních skupin daného odběru (viz graf č.3).

Na VAP rychlost spermií měla injekce hormonálních preparátů značný vliv. Signifikantní rozdíly jsme zaznamenali opět po 48 hodinách u skupin PLGA+MET ($20\mu\text{g GnRHa}\cdot\text{kg}^{-1}+20 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) a PLGA ($20\mu\text{g GnRHa}\cdot\text{kg}^{-1}$), která byla během daného odběru signifikantně rozdílná od skupiny CPE ($2\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). Z původního stavu $105 \pm 10 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ u PLGA+MET a $110 \pm 15 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ u PLGA se po 48 hodinách rychlost zvýšila na $118 \pm 8 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ a $125 \pm 5 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$. Po 96 hodinách se VAP rychlost pohybu spermií zmíněných skupin pohybovala na úrovni $120 \pm 5 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ a byla signifikantně rozdílná od kontroly s rychlostí $100 \pm 10 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ (viz graf č.4).

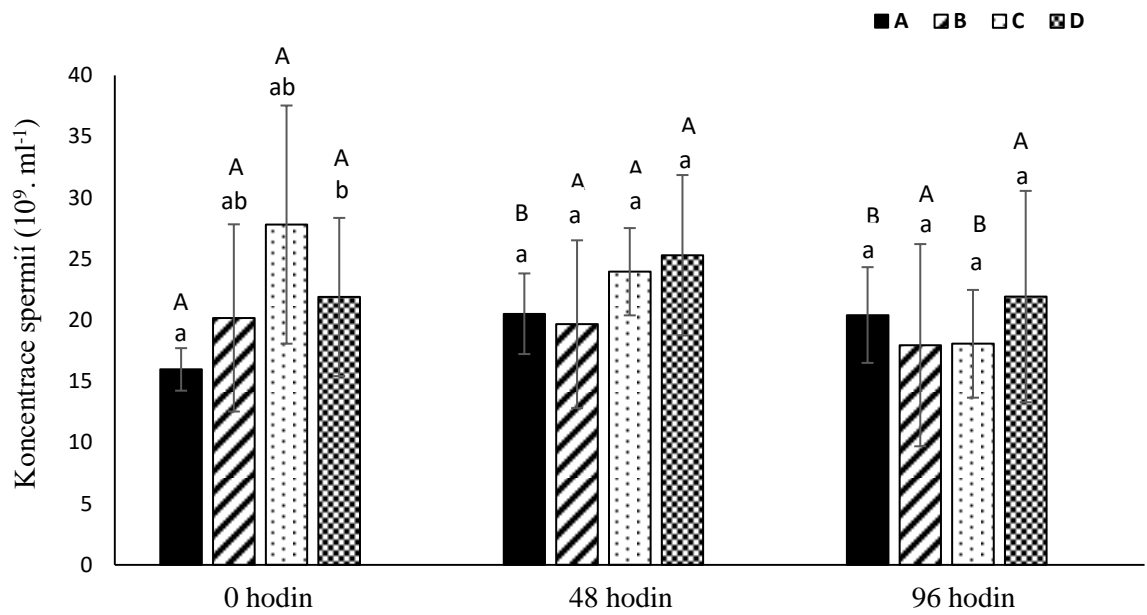
Účinek hormonálních preparátů se na VCL rychlost spermií projevil po 48 hodinách, kdy jsme zaznamenali významný rozdíl u skupiny PLGA+MET ($20\mu\text{g GnRHa.kg}^{-1}+20\text{ mg.kg}^{-1}$), u které se VCL rychlost zvýšila ze $110 \pm 10 \mu\text{m.s}^{-1}$ na $125 \pm 5 \mu\text{m.s}^{-1}$. V daném odběru byla od ostatních skupin signifikantně odlišná skupina CPE. Po 96 hodinách se rychlost spermií kontrolní skupiny signifikantně snížila na $110 \pm 10 \mu\text{m.s}^{-1}$ a byla rozdílná od ostatních skupin, jejichž rychlost činila $125 \pm 5 \mu\text{m.s}^{-1}$ (viz graf č.5).

VSL rychlost spermií je po 48 hodinách u kontrolní skupiny a PLGA+MET ($20\mu\text{g GnRHa.kg}^{-1}+20\text{ mg.kg}^{-1}$) skupiny signifikantně rozdílná od jejich původních hodnot, které se z $90 \pm 5 \mu\text{m.s}^{-1}$ u kontroly a $83 \pm 10 \mu\text{m.s}^{-1}$ u PLGA+MET zvýšily na $100 \pm 5 \mu\text{m.s}^{-1}$ a $90 \pm 7 \mu\text{m.s}^{-1}$. Zároveň je v tomto odběru skupina CPE rozdílná od kontrolní a PLGA ($20\mu\text{g GnRHa.kg}^{-1}$) skupiny. Po 96 hodinách došlo k poklesu rychlosti spermií v kontrolní skupině. V odběru po 96 hodinách se lišila od ostatních skupin PLGA ($20\mu\text{g GnRHa.kg}^{-1}$) skupina (viz graf č.6).

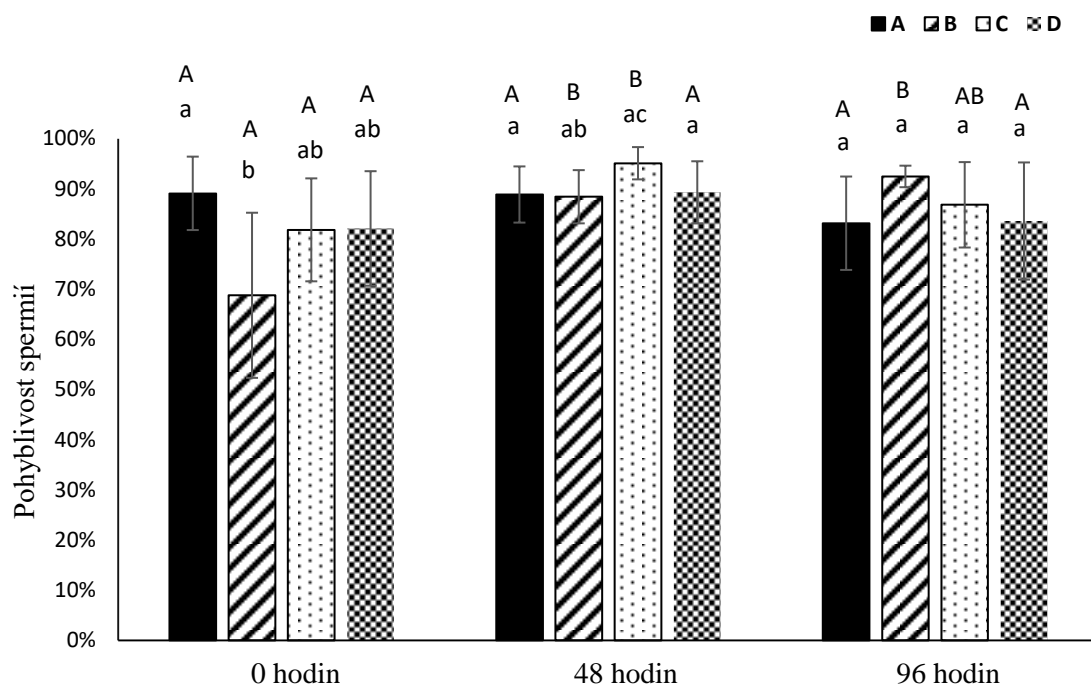
K výrazným rozdílům došlo u měření hladiny 11-ketotestosteronu. Kdy se původní průměrná hladina všech skupin $2,5 \pm 0,5 \text{ ng.ml}^{-1}$ snížila po 48 hodinách na $1,2 \pm 0,25 \text{ ng.ml}^{-1}$ u skupin CPE i PLGA+MET ($20\mu\text{g GnRHa.kg}^{-1}+20\text{ mg.kg}^{-1}$) a na $1,0 \pm 0,4 \text{ ng.ml}^{-1}$ u skupiny PLGA ($20\mu\text{g GnRHa.kg}^{-1}$). Po 48 i 96 hodinách nebyl zaznamenaný signifikantní rozdíl mezi zmíněnými skupinami a byly v obou měřeních signifikantně rozdílně od kontrolní skupiny (viz graf č.7).



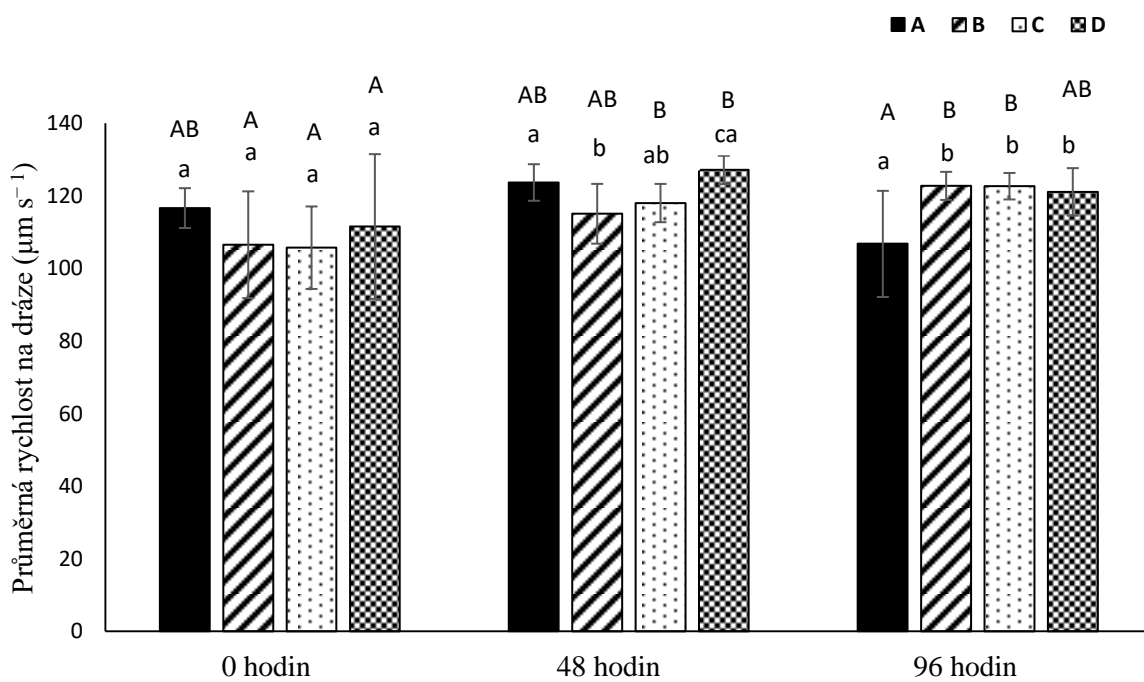
Graf č.1: Objem mlíčí (ml) odebraný v různých časových intervalech.



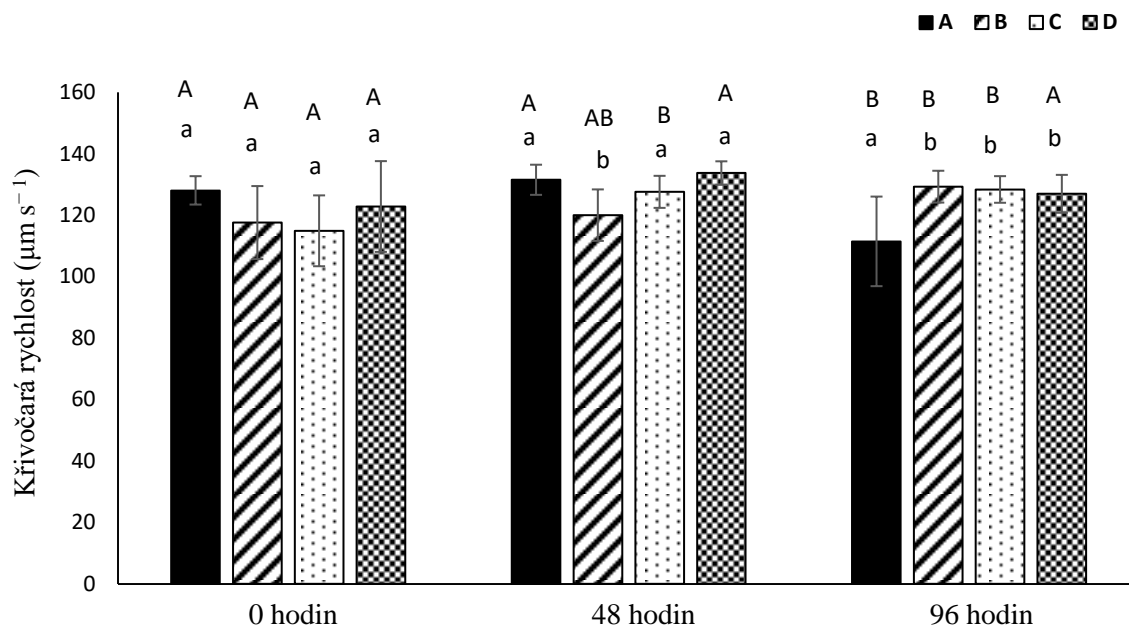
Graf č.2: Koncentrace spermií ($10^9 \cdot \text{ml}^{-1}$) odebraný v různých časových intervalech.



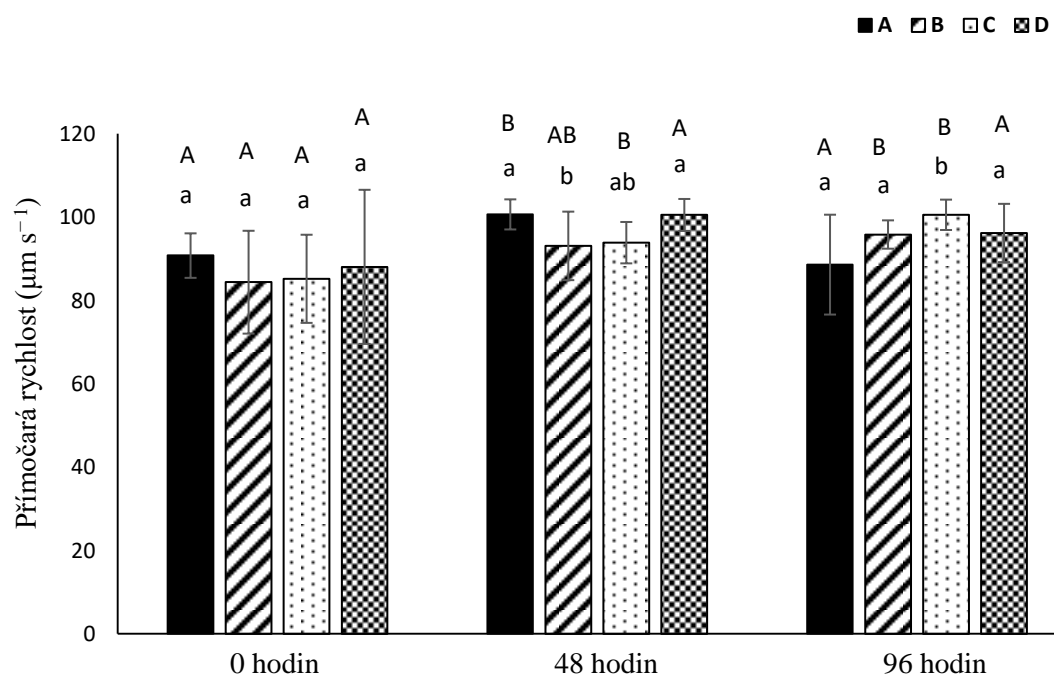
Graf č.3: Pohyblivost spermií (%) v různých časových intervalech ihned po odebrání.



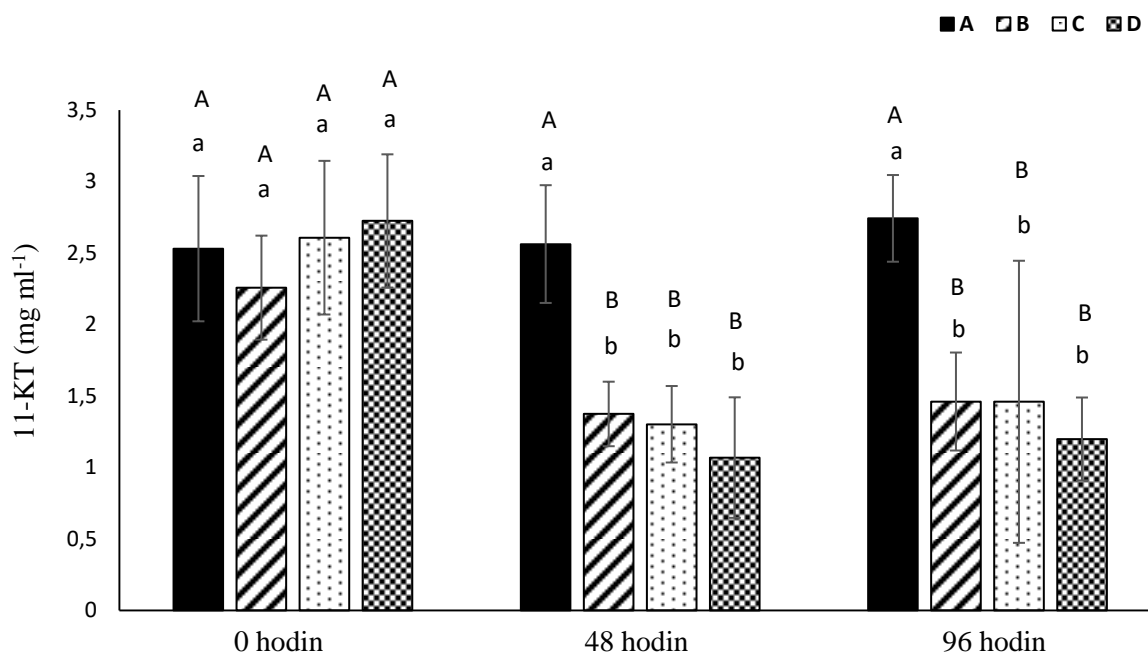
Graf č.4: Rychlost spermií VAP ($\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$), měřeno po dobu 10s.



Graf č.5: Rychlost spermií VCL ($\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$), měřeno po dobu 10s.



Graf č.6: Rychlost spermií VSL ($\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$), měřeno po dobu 10s.



Graf č.7: Koncentrace 11-KT (mg.ml⁻¹) v krevní plasmě odebrané v různých časových intervalech po injekci hormonálního přípravku.

4.2 Experiment – Jikernačky 2019

V dosažení ovulace se od ostatních výrazně lišily 2 skupiny. Přičemž skupina PLGA+MET (40μg GnRHa.kg⁻¹+20 mg.kg⁻¹), která dosáhla 50 % ovulace, byla signifikantně rozdílná od kontroly, skupiny CPE 4 mg.kg⁻¹ i PLGA+MET (20μg GnRHa.kg⁻¹+20 mg.kg⁻¹). Skupina PLGA (40μg GnRHa.kg⁻¹), která dosáhla 40 % ovulace, byla signifikantně rozdílná od všech skupin kromě skupiny PLGA (40μg GnRHa.kg⁻¹) (viz graf č.8).

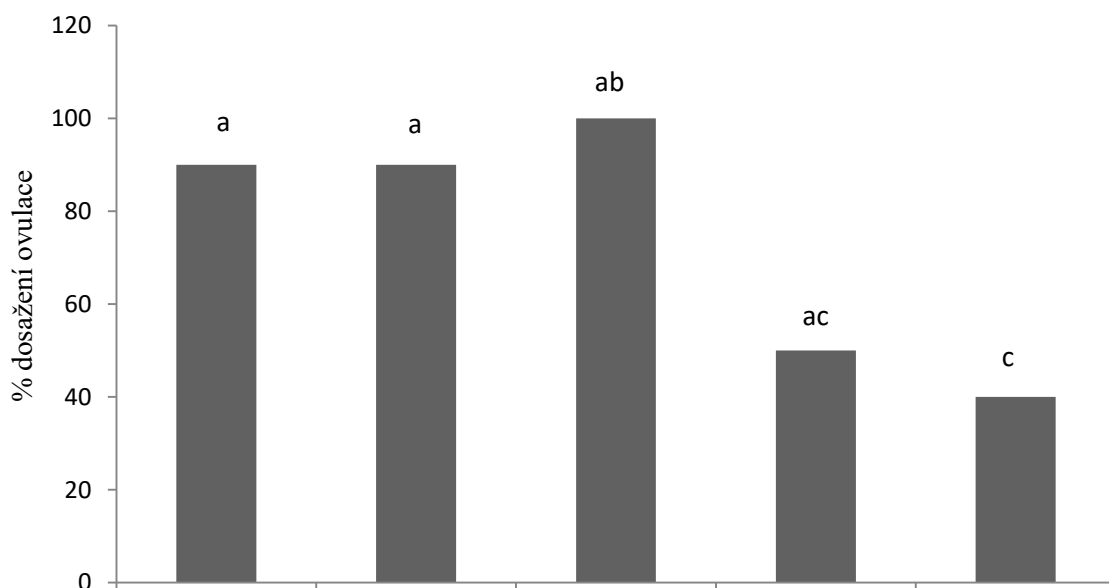
U oplozenosti jsme nezaznamenali žádné signifikantní rozdíly, avšak vyšších hodnot jsme dosáhli po aplikaci PLGA+MET (40μg GnRHa.kg⁻¹+20 mg.kg⁻¹) (viz graf č.9).

U líhivosti byly kontrola a skupina PLGA+MET (40μg GnRHa.kg⁻¹+20 mg.kg⁻¹) s hodnotou 77,68 ± 16,7 % signifikantně rozdílné od skupiny PLGA (40μg GnRHa.kg⁻¹) s hodnotou 16,32 ± 30,51 % (viz graf č.10).

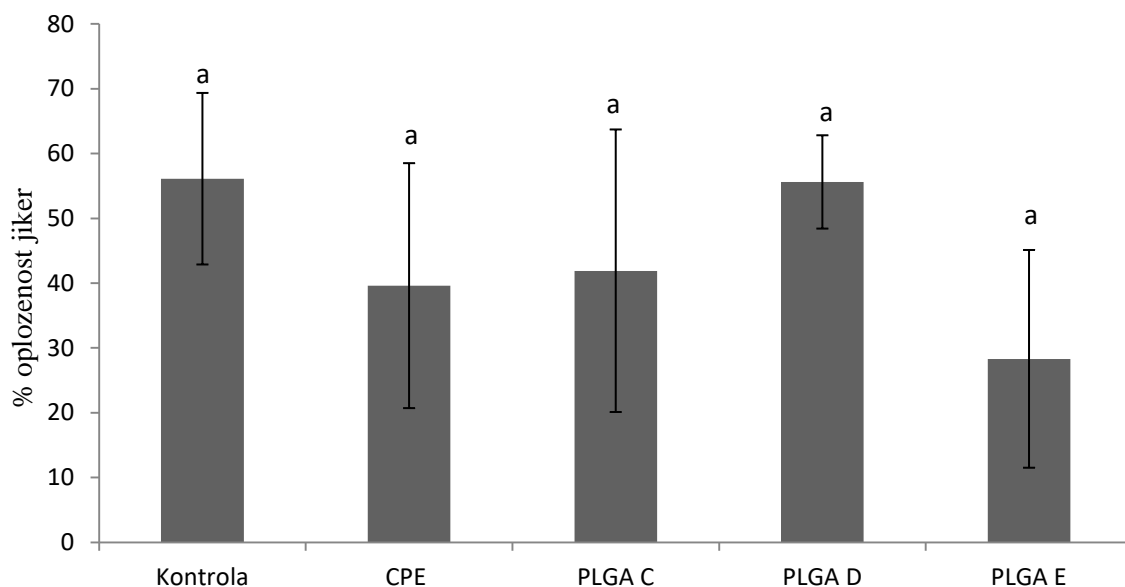
V experimentu s jikernačkami jsme také dokázali pozitivní účinky mikročástic. Aplikací PLGA+MET (20μg GnRHa.kg⁻¹+20 mg.kg⁻¹) se oproti kontrole zkrátila doba latence na 94 ± 68 h (o 42h méně). Aplikace vyšší dávky PLGA+MET (40μg

GnRHa.kg⁻¹+20 mg.kg⁻¹) naopak prodloužila dobu latence na 154 ± 97 h. Statisticky se nejednalo o signifikantní rozdíl (viz graf č.11).

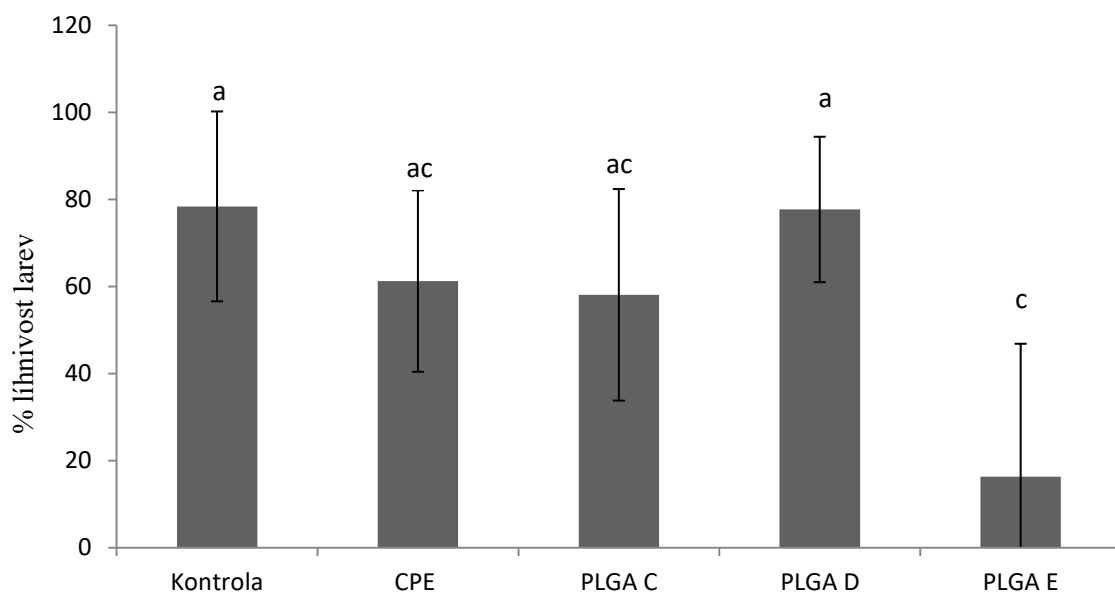
Signifikantní rozdíl jsme však zaznamenali u absolutní plodnosti, která po aplikaci CPE (4 mg.kg⁻¹) činila 38 593 ± 14 493 ks jiker, zatímco po aplikaci PLGA+MET (20μg GnRHa.kg⁻¹+20 mg.kg⁻¹) byla 20 327 ± 6 342 ks jiker. U relativní plodnosti jsme nezaznamenali žádný signifikantní rozdíl (viz graf č.12 a č.13).



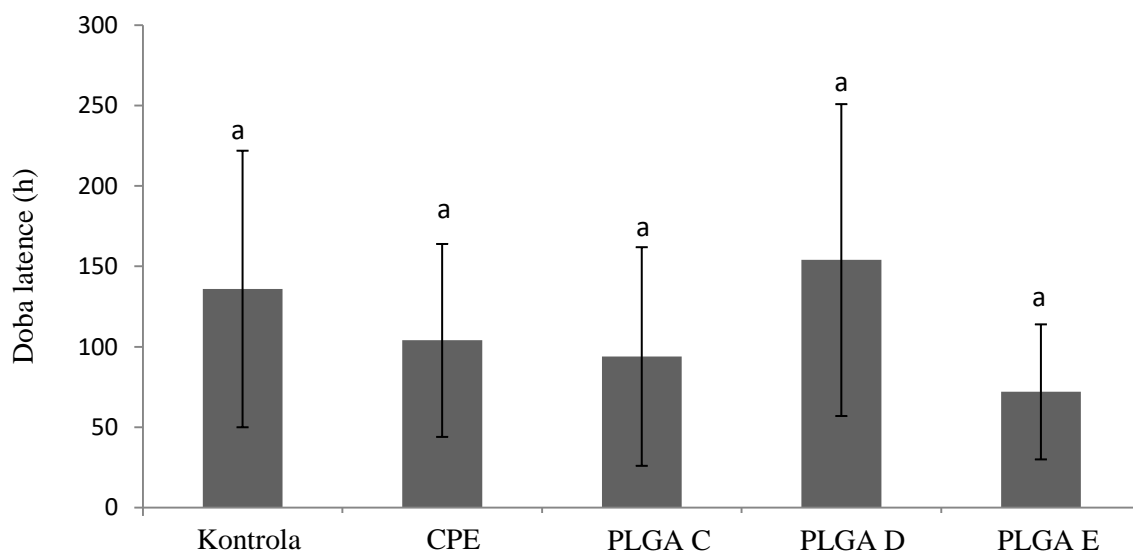
Graf č.8: Dosažení ovulace (%) jednotlivých skupin.



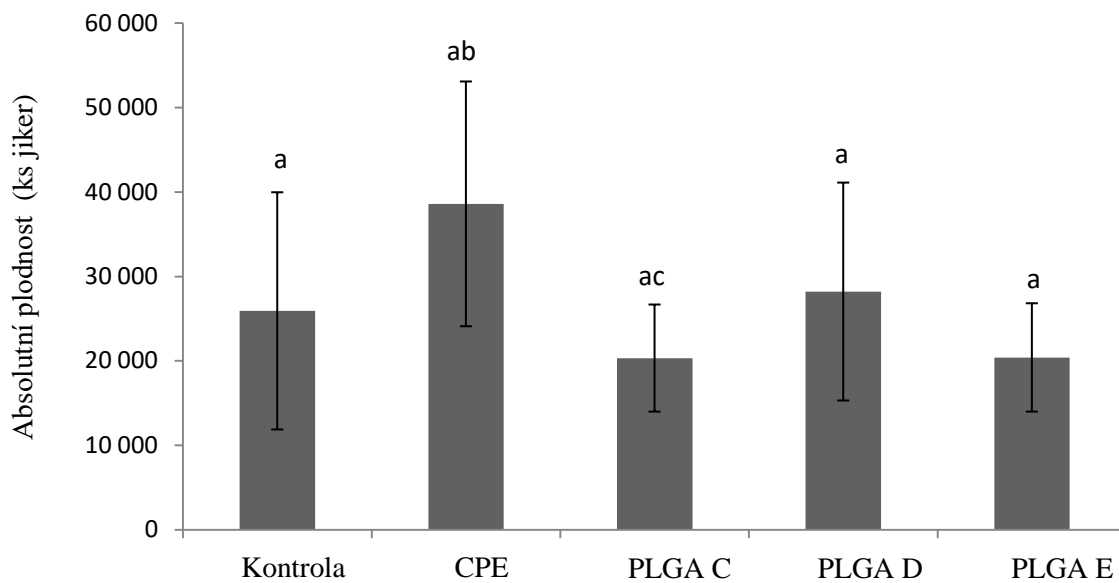
Graf č.9: Oplozenost jiker (%) jednotlivých skupin.



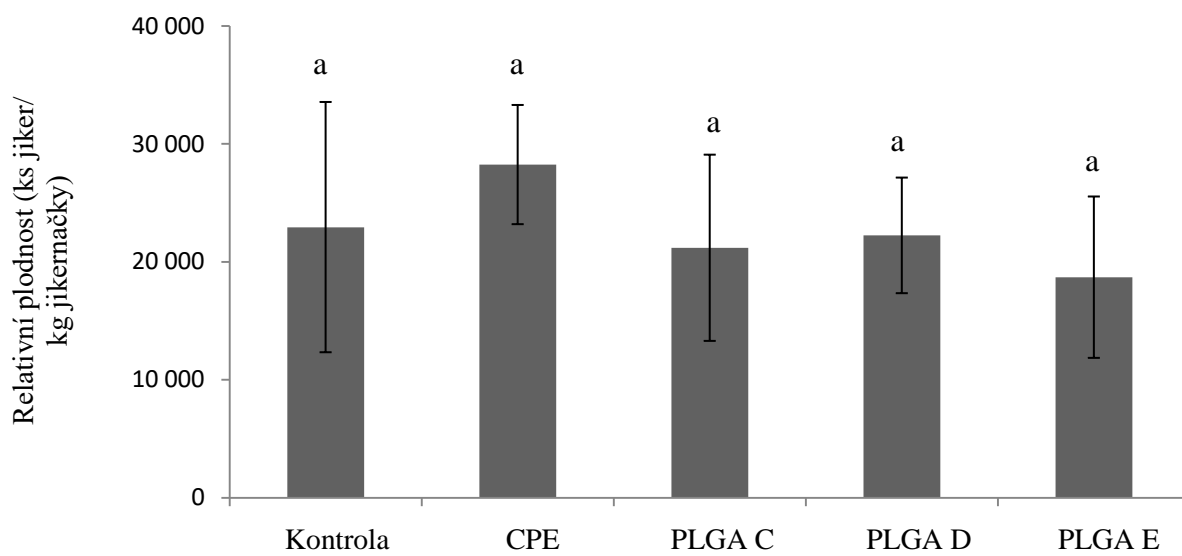
Graf č.10: Lůživost larev (%) jednotlivých skupin.



Graf č.11: Doba latence (h) jednotlivých skupin.



Graf č.12: Absolutní plodnost jednotlivých skupin.



Graf č.13: Relativní plodnost jednotlivých skupin.

5 DISKUSE

Cílem námi provedené studie bylo vyhodnocení účinnosti připravených hormonálních přípravků na optimalizaci hormonální indukce ovulace a spermiace u hospodářsky významného druhu ryb, štiky obecné (*Esox lucius*). Nosičem hormonálních látek byly mikročástice z kopolymerů kyseliny mléčné a kyseliny glykolové (PLGA). Dle Wischkeho a Schwendemana (2008) se jedná o injikovatelné biologicky odbouratelné a biokompatibilní kopolymery kyseliny mléčné a glykolové. Pomocí tohoto nosiče jsme zajistili kontrolované kontinuální uvolňování GnRHa po dobu 4 až 7 dnů. Známé jsou i pokusy s nanočásticemi, kde Rather a kol., (2013) říká, že systém podávání s řízeným uvolňováním pomáhá překonat problém krátké životnosti hormonu uvolňujícího luteinizační hormon (LHRH) v krvi a předchází tak opakované injekci pro zvýšení reprodukční účinnosti. Účinek GnRHa jsme podpořili aplikací dopamin antagonisty, metoclopramidu. Ten eliminuje účinky dopaminu, který ryba vylučuje v případě, že vyhodnotí aktuální podmínky prostředí jako neideální pro reprodukci (Trudeau a Peter, 1995).

Použití samotného mGnRHa se obecně jeví jako neúčinné na indukci ovulace u štiky obecné. K podobným závěrům dospěl i Billard a Marcel (1980), kdy se snažili zachránit snižující se stavy štik ve vodách. Svůj výzkum prováděli na jikernačkách o průměrné hmotnosti 500g. Použili hned několik hormonálních přípravků. Intrakardiální injekce superaktivního analogu GnRH neměla žádný účinek na navození ovulace. Intraperitoneální injekce GnRH v emulgované formě nevyvolala ani zrání oocytů ani ovulaci. Podobných výsledků dosáhnul také Bondarenko a kol. (2015), kdy byl testován lososový D-Arg6 Pro9NEt-GnRHa, který rovněž neprokázal účinnost. Szabó (2013) říká, že tradiční léčba analogem GnRH v čisté formě je při indukci ovulace u štiky obecné (*Esox lucius L*), neúčinná. Diskutován je nedostatečný účinek analogu GnRH (Billard a Marcel, 1980).

Značné množství autorů se zabývalo využitím antagonisty dopaminu pro zlepšení účinku GnRHa (Drori a kol. (1994) u Cypriniformes; Joy a Tharakan (1999) u Siluriformes; Van Der Kraak a kol. (1986) u Salmonidae; Kucharczyk (2008) u Percidae). Metoda indukovaného výtěru ušlechtilých druhů ryb pomocí léčby analogem gonadotropin uvolňujícího hormonu (GnRH) a dopamin antagonisty se ukázala jako efektivní již v devadesátých letech minulého století, kdy Peter a kol. (1988) prováděli výzkumy u Cypriniformes. Kombinace těchto dvou účinných látek je známá též jako

metoda Linpe, pojmenována dle svých autorů Lin a Peter (Peter a kol. (1988)). Avšak u štiky obecné nevedla aplikace mGnRHa v kombinaci s pimozidem (mGnRHa), metoclopramidem (mGnRHa) nebo domperidonem (sGnRHa) k ovulaci (Szabó, 2013; Bondarenko a kol., 2015).

Použili jsme také kapří hypofýzu (4 mg.kg^{-1}), kterou jsme dosáhli ovulace u 90 % ryb, oplozenosti $39,6 \pm 18,9 \%$, líhivosti $61,23 \pm 20,84 \%$ a vysoké plodnosti, přičemž relativní plodnost činila $28\,243 \pm 5053 \text{ ks jiker.hmotnost ryby}^{-1}$.

Billard a Marcel, (1980) říkají, že u jikernaček indukoval částečně purifikovaný s-GtH (PPSG) 90 % a 100 % ovulaci v dávkách 50 a $25 \mu\text{g.kg}^{-1}$ tělesné hmotnosti. Sušená hypofýza ($2,5 \text{ mg.kg}^{-1}$, což odpovídá $50 \mu\text{g PPSG}$) vyvolala 25 % ovulaci; při 10 mg.kg^{-1} bylo opět zaznamenáno 25 % úplné ovulace, ale kromě toho 70 % samic vykazovalo zrání oocytů a částečnou ovulaci. Podobně v další skupině, kde sušená kapří hypofýza (3 mg.kg^{-1}) indukovala pouze zrání oocytů, ale ne ovulaci. Oocyty získané po hormonální léčbě byly obecně plodné. S PPSG pracoval i De Montalembert a kol. (1978), kdy dosáhli předčasné ovulace jednorázovou injekcí PPSG. K aplikaci muselo dojít brzy po odchycení jikernaček, aby se zabránilo ovariální atrezii.

Szabó (2013) podporuje kapří hypofýzu a porovnává ji s jinými hormonálními terapiemi. Říká, že zatímco ve skupině injikované kapří hypofýzou většina jikernaček ovulovala, přípravek Dagin nevyvolal ovulaci. Léčba přípravkem Ovaprim vedla k podobné nebo nižší míře ovulace v porovnání s léčbou kapří hypofýzou. Po ošetření tímto přípravkem nebyla doba latence tak předvídatelná jako po injekci kapří hypofýzou. Průměrná oplozenost jiker byla relativně nízká a podobná u skupin léčených Ovaprimem ($54,7 \pm 12,3 \%$ a $58,7 \pm 19,1 \%$ pro první a druhý experiment) a hypofýzou kapra ($53,7 \pm 10,5 \%$ a $58,9 \pm 14,9 \%$). Průměrný pseudogonadosomatický index (PGSI) byl také podobný u obou skupin - Ovaprim ($14,5 \pm 6,1 \%$), kapří hypofýza ($17,9 \pm 4,1 \%$). V tomto experimentu byla léčba Ovaprimem méně účinná než léčba kapří hypofýzou.

Použití kapří hypofýzy bylo úspěšné i během výzkumu Bondarenka a kol. (2015), ve kterém se zabývali porovnáváním různých postupů, jak docílit ovulace u štiky obecné (*Esox lucius* L.), kdy CP bylo nejefektivnější. Přípravky byly porovnávány se skupinou v kontrolovaných podmínkách (skupina ICC, injikovaná fyziologickým roztokem bez hormonálního přípravku) a dvěma tradičními přípravky: 3 mg.kg^{-1} kapří hypofýzy (skupina CP) a venkovní podmínky (skupina AOC, injikovaná fyziologickým roztokem bez hormonálního přípravku). U všech ryb ve skupině CP a u 70 % skupiny AOC došlo

k ovulaci. Doba latence skupiny CP byla 96 ± 4 h a 264 ± 58 h u skupiny AOC. Oplozenost dosáhla $88,6 \pm 4,5$ % u skupiny AOC; $85,5 \pm 12,0$ % u skupiny 3 a $66,0 \pm 13,7$ % u skupiny CP. Líhňivost byla $68,6 \pm 9,9$ u AOC %; $65,5 \pm 7,5$ % skupina 3 a $54,4 \pm 8,0$ % u CP.

Použitím nosiče s dlouhodobým uvolňováním jsme dosáhli uspokojivých výsledků. Použitím kombinace PLGA+MET ($20\mu\text{g GnRHa.kg}^{-1}+20 \text{ mg.kg}^{-1}$) se podařilo dosáhnout ovulace u všech ryb. Avšak v kontrole ovulovalo 90 % jikernaček. Oproti kontrole se doba latence zkrátila na 94h (o 42h méně). Vyšší dávkou ($40\mu\text{g GnRHa.kg}^{-1}+20 \text{ mg.kg}^{-1}$) jsme dosáhli poloviční ovulace, avšak velmi uspokojivých výsledků oplozenosti $55,6 \pm 7,2$ %, líhňivosti $77,68 \pm 16,7$ % i absolutní a relativní plodnosti, která se převyšovala nebo se rovnala kontrole. Použití PLGA bez MET bylo neúčinné.

Zajímavých výsledků dosáhl při takovém výzkumu (Szabó, 2001) s přípravkem pryskyřice Carbopol. Říká, že i když ovulace štiky obecné může být indukována injekcí roztoku kapří hypofýzy a fyziologického roztoku, neúplná ovulace a nízká míra oplozenosti zabraňují rozsáhlé produkci plůdku. Hypofyzární léčba byla modifikována použitím nosiče s prodlouženým uvolňováním. Tím jsou hydrofilní biologicky odbouratelné matrice sodné soli karboxymethylcelulózy (CMC-Na) a pryskyřice Carbopol. Podávání kapří hypofýzy v 8,0 % roztoku CMC-Na nebo ve 2,0 % vodné disperzi pryskyřice Carbopol poskytlo v některých pokusech vyšší průměrný index plodnosti a zlepšenou oplozenost jiker než injekce hypofýzy ve fyziologickém roztoku. Výsledky naznačují, že na štiky obecné může míra zvýšení hormonu vyvolávajícího ovulaci ovlivnit relativní množství a oplozenost ovulovaných vajíček. Určité modifikace v podávání hormonů tak mohou zlepšit techniku indukovaného výtěru tohoto druhu.

Szabó (2008) dále říká, že efektivita produkce plůdku štiky obecné pomocí hormonální léčby na jaře vylovených štik je obecně relativně nízká vzhledem k nízkému procentu oplozených vajíček. Bylo experimentálně prokázáno, že podávání kapří hypofýzy vysušené acetonem prostřednictvím nosiče s postupným uvolňováním na bázi vodné disperze pryskyřice Carbopol 971 P (CP) vedlo k vyššímu průměrnému procentu oplozenosti. Pravděpodobně z důvodu, že postupné uvolňování hormonu by mohlo optimálně kontrolovat dozrávání a ovulaci folikulů ve vaječniku. Tato nová metoda hormonální indukce ovulace byla testována ve velkoprodukční líhni zaměřené na štiky a chov plůdku. V této studii byly analyzovány údaje o oplozenosti jiker v letech 2002 až 2006 na dvou významných líhních v Maďarsku. Podávání hypofýzy sušené v acetonu prostřednictvím nosiče s 2,5 % CP mělo za následek vyšší oplodnění ($76,4 \pm 7,7$ %;

průměr \pm SD) ve srovnání se skupinou s fyziologickým roztokem ($59,3 \pm 10,8$ %). Použité vehikulum neovlivnilo poměr ovulace. Podle zmíněných výsledků by mohla mít tato nová metoda široké uplatnění v intenzivním chovu štiky obecné.

Szabó a kol. (2014) následně porovnávali efekt tolstolobikové hypofýzy (SCPE) a kapří hypofýzy (CPE) na chovu štiky obecné a kapra obecného. Dávka $3,5 \text{ mg kg}^{-1}$ byla navázána na nosič 2,5 % vodní disperze pryskyřice Carbopol (Szabó, 2008). Aplikace proběhla peritoneální injekcí $0,5 \text{ ml kg}^{-1}$ BW. Po 4 dnech došlo k výtěru. V prvním roce dosáhlo ovulace 70,4 % jikernaček štiky v obou skupinách s gonadosomatickým indexem (GSI) 14,3 %. V dalším roce to bylo 94,4 % u CPE a 87 % u SCPE s GSI $18,7 \pm 3,43$ % a $20,1 \pm 3,92$ %. Oplozenost byla oba roky stejná, pohybovala se kolem 55 ± 55 %. Jikernačky kapra dosáhly po aplikaci CCPE míry ovulace 66,7 % a po SCPE 100 %. Kromě ovulace u kapra byly rozdíly mezi přípravkami statisticky nevýznamné.

Bondarenko a kol. (2015) testovali jiný typ nosiče, kterým bylo tzv. nekompletní Freundovo adjuvans (FIA). Experiment probíhal bez antagonisty dopaminu: 50 a 100 $\mu\text{g GnRHa.kg}^{-1}$ emulgované s FIA i s antagonistou dopaminu: 50 a 100 $\mu\text{g GnRHa.kg}^{-1}$ emulgované s FIA a 8 mg.kg^{-1} metoclopramidu. Tento nosič však nebyl příliš efektivní.

Cejko a kol. (2016) se kromě hormonální stimulace zabývali i metodami získávání jiker pro zlepšení efektivity chovu štiky obecné. V této studii byla porovnána klasická metoda vytlačování jiker, palpáce a pneumatická metoda využívající vzduch (podtlak). Následně byl porovnán efekt různých aktivačních roztoků (Billardův roztok, líhňářská voda, Woynarovichův roztok) na oplozenost jiker během umělého výtěru. Hodnoty PGSI vzorků jiker po odběru pomocí pneumatické metody byly nižší ($13,8 \pm 3,9$ %), ale statisticky se nelišily od tradiční metody, palpací ($16,5 \pm 5,4$ %). Líhňářská voda a Woynarovichův roztok byly nejvhodnější pro aktivaci spermií a následnou oplozenost. Ukázalo se, že klasická metoda negativně ovlivňovala míru oplozených jiker a procento líhňivosti ve vzorcích oplozených v líhňářské vodě a Woynarovichovu roztoku. Míra oplozenosti po odběru jiker pneumatickou metodou a oplození pomocí líhňářské vody či Woynarovichova roztoku vedla k vyšší oplozenosti ($86,2 \pm 9,3$ % a $92,4 \pm 3,9$ %). Zároveň byla vyšší líhňivost ($83,0 \pm 8,4$ % a $88,3 \pm 6,2$ %).

Hormonální indukci spermiace mlíčáků štiky obecné se v minulosti zabývala spousta výzkumníků a dospěli k poznatkům, které by mohly přispět k lepší efektivitě chovu tohoto druhu. Mlíčáci uvolňují jen malé množství mlíčí v rozmezí 0,1 až 1,2 ml, obvykle však jen 0,3 – 0,5 ml (Linhart, 1985). Proto se v praxi, z důvodu nízkého počtu mlíčáků, přistupuje k jejich usmrcování, vyjmutí testes a použití testikulárního spermatu

pro oplození jiker (Linhart a Pokorný, 1984). Hulák a kol. (2008) naměřili u 37 mlíčáků, bez hormonálního ošetření, průměrnou produkci mlíčí $1,2 \pm 0,8$ ml. Významně vyšší koncentrace spermií byla pozorována v testikulárním spermatu (TS) ($34 \pm 5 \times 10^9 \cdot \text{ml}^{-1}$) než ve spermatu získaném masáží břišní části (SS) ($23 \pm 4 \times 10^9 \cdot \text{ml}^{-1}$). TS i SS vykazovaly po zředění v moči podstatně vyšší rychlost a pohyblivost spermií než po aktivaci v destilované vodě v průběhu aktivity. Motilita spermií byla 15 sekund po aktivaci destilovanou vodou s BSA (používá se proti přilepení hlavičky spermie ke sklíčku) 62 ± 5 % u SS i TS a po zředění močí 90 ± 10 % u SS a 100 ± 10 % u TS a rychlost spermií 163 ± 40 u SS a $173 \pm 39 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ u TS, rychlost však není blíže specifikována. Kvalita spermatu jednotlivých mlíčáků se může razantně lišit a ovlivnit výsledek celého výtěru. Proto je vhodné kontrolovat kvalitu spermií po odběru či používat sperma vícero mlíčáků najednou (Babiak a kol., 2008).

Na úbytek štik ve vodách reagovali Billard a Marcel (1980) s jejich výzkumem hormonální terapie, která by v řízených podmínkách zlepšila stavy štik. Zralí mlíčáci podstoupili v březnu a dubnu různou hormonální léčbu, jejichž cílem byla stimulace spermiace. Intrakardiální injekce superaktivního analogu GnRH neměla žádný účinek na stimulaci spermiace.

Někteří autoři testují účinnost kombinovaného použití GnRHa s antagonistou dopaminu. Cejko a kol. (2018) se zabývali výzkumem, ve kterém používají přípravek Ovaprim, obsahující sGnRH spolu s antagonistou dopaminu, domperidonem a srovnávají tuto metodu s CPE. Mlíčí bylo odebráno 48 hodin po injekci, masáží břišní části. Výsledky ukázaly, že hormonální terapie má pozitivní efekt na dozrávání mlíčí. Rozdíl v produkci mlíčí mezi skupinou injikovanou CPE v dávce $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ a skupinou injikovanou Ovaprimem v dávce $0,5 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1}$ nebyl signifikantní, stejně jako rozdíl v pohyblivosti mlíčí exponovaných a neexponovaných skupin. Motilita činila $95,3 - 96,6$ %, produkce mlíčí byla $3,07$ ml s koncentrací spermií $3,18 \cdot 10^9 \cdot \text{ml}^{-1}$ a byla signifikantně odlišná od neexponované skupiny s $0,12$ ml a koncentrací spermií $1,17 \cdot 10^9 \cdot \text{ml}^{-1}$. VCL rychlost spermií byla stejná u všech skupin, pohybovala se mezi $282,8$ a $309,4 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$. VSL rychlost byla po aplikaci Ovaprimu $220,6 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ a po aplikaci CPE $186,6 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$. Nejrazantnější rozdíl byl v progresivní pohyblivosti spermií, která byla po léčbě Ovaprimem $51,4$ %, u kontroly $36,6$ % a u CPE $37,7$ %. Stejný princip indukce spermiace použil Król (2009), kdy testoval účinnost léčby přípravkem Ovopel (mGnRHa+metaclorpramid) a Ovaprim (sGnRHa + domperidon) na množství a kvalitu mlíčí korušky evropské (*Osmerus eperlanus*). Výsledkem obou přípravků byla

stimulace spermiace (100 % oproti 68 % v kontrolní skupině). Zatímco léčba Ovaprimem zvýšila objem a celkovou produkci mlíčí, léčba Ovopelem produkovala spermie s vyšším procentem motility. Mezi parametry pohyblivosti spermií byla pouze amplituda laterálního posunu hlavy (ALH) významně odlišná od kontroly u obou hormonálně léčených skupin.

Po použití CPE (2 mg.kg⁻¹) jsme po 48 hodinách naměřili razantní zvýšení objemu mlíčí, které se zvýšilo z 900 ± 400 ml na 2200 ± 300 ml. Zvýšila se také pohyblivost z 68 ± 15 % na 88 ± 5 %. Průměrná VSL rychlost byla 93 ± 7 μm.s⁻¹. Průměrná koncentrace činila 19,26 ± 7,6.10⁹.ml⁻¹. Cejko a kol., (2018) dosáhli podobných výsledků. Použili rovněž CPE v dávce 2 mg.kg⁻¹ Motilita činila 95,3 – 96,6 %, produkce mlíčí byla 3,07 ml s koncentrací spermií 3,18.10⁹.ml⁻¹ a byla signifikantně odlišná od neexponované skupiny s 0,12 ml a koncentrací spermií 1,17.10⁹.ml⁻¹ a VSL rychlost byla po aplikaci CPE 186,6 μm.s⁻¹. Billard a Marcel (1980) testovali také kapři hypofýzu, kdy se celkové množství spermií odebrané po léčbě zvýšilo ve srovnání se samci injikovanými fyziologickým roztokem s hodnotou 64 ± 55 ml o 3 – 11 násobek s částečně purifikovaným lososovým gonadotropinem (aktivita PPSG: polovina vysoce purifikovaného s-GTH; injekce v dávkách mezi 5 a 100 μg.kg⁻¹ tělesné hmotnosti); o 3 – 6 násobek se surovou kapří hypofýzou (0,5–3 mg.kg⁻¹ tělesné hmotnosti), kde po maximální dávce CPE 3 mg.kg⁻¹, byla naměřena hodnota 422 ± 227 ml; a o 3–7 násobek s čerstvou štíčí hypofýzou (14 a 1,2 mg vlhké hmotnosti.kg⁻¹ tělesné hmotnosti). Spermie získané po hormonální léčbě měly dobrou kvalitu.

V našem experimentu byl u mlíčáků prokázán výrazný účinek nosičů v podobě mikročástic PLGA. Použitím PLGA bez MET se během našeho experimentu zvýšil objem spermatu ze 750 ± 300 ml na 1250 ± 200 ml. Po 48 hodinách po aplikaci byla pohyblivost spermií 95 % a VAP rychlost se zvýšila ze 110 ± 15 μm.s⁻¹ na 125 ± 5 μm.s⁻¹. Použitím PLGA (20μg GnRHa.kg⁻¹) a dopamin antagonisty metoclopramidu (MET, 20 mg.kg⁻¹) se objem vyprodukovaného mlíčí oproti kontrole zdvojnásobil na 2100 ± 700 ml. Zároveň se tímto ošetřením zlepšily všechny pozorované parametry rychlostí spermií (VAP, VCL, VSL). 48 hodin po aplikaci PLGA+MET byla VAP rychlost spermií 118 ± 8 μm.s⁻¹. Rychlost VCL dosahovala 48 hodin po aplikaci PLGA+MET 130 ± 5 μm.s⁻¹. Rychlost VSL byla po 48 hodinách po aplikaci 90 ± 7 μm.s⁻¹. Na koncentraci spermií však neměla hormonální terapie efekt.

Hladina 11-ketotestosteronu se po 48 hodinách po injekci snižovala u všech skupin kromě kontroly. Původní koncentrace 2,5 ± 0,5 ng.ml⁻¹ se u zmíněných skupin snížila

na $1,25 \pm 0,3 \text{ ng.ml}^{-1}$. Podobného výsledku dosáhli Clearwater a Crim (1998) u platýse zlatého (*Pleuronectes ferrugineus*), kdy se po injekci GnRH α zvýšila produkce mlíčí a plasmatická koncentrace se po injekci z původních $4 \pm 1,1 \text{ ng.ml}^{-1}$ snížila po dvou dnech na $1,8 \pm 0,8 \text{ ng.ml}^{-1}$.

Velmi pozitivním výsledkem je, že všichni mlíčáci ošetřeni PLGA bez i s MET pouštěli mlíčí. Toto zjištění může mít velký dopad v praxi, jelikož by se nemuselo přistupovat k zabíjení samců z důvodu nízké spermiace (Lahnsteiner a kol., 1998).

Náš výzkum potvrdil, že aplikace mikročástic PLGA s navázaným GnRH α , a především v kombinaci s dopamin antagonistou metoclopramidem má, ve správné koncentraci, vliv na vývoj gonád, jejich kvalitu a následně i na samotnou ovulaci a spermiaci štiky obecné. Můžeme předpokládat, že toto hormonální ošetření má veliký potenciál pro užívání ve velkoprodukčních chovech, kde by mohlo pozvednout produkci štiky obecné a možná i jiných druhů ryb.

6 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo identifikovat druhově optimální složení přípravku na bázi PLGA mikročastic z hlediska délky a intenzity uvolňování a složení účinné látky (GnRHa, metoclopramide), která by mohla být využívána v umělé reprodukci vybraného druhu ryb – štiky obecné (*Esox lucius*).

Použitím PLGA jsme u mlíčáků dosáhli pozitivních výsledků ve všech našich měřeních. Aplikací PLGA bez dopamin antagonisty (MET) se objem mlíčí zvýšil ze 750 ± 300 ml na 1250 ± 200 ml. Velmi uspokojivých výsledků jsme dosáhli i po aplikaci PLGA+MET, kdy se objem mlíčí zvýšil z 1000 ± 400 ml na 2100 ± 700 ml. Aplikace těchto přípravků neměla efekt na koncentraci spermií, avšak měla značný vliv na pohyblivost spermií. K nejvýraznějšímu zvýšení došlo po 48 h po aplikaci PLGA, kdy se pohyblivost zvýšila z 80 ± 15 % na téměř 95 %. Aplikace PLGA i PLGA+MET způsobuje v prvních dnech její znatelné navýšení, avšak v dalších dnech se pomalu snižuje. Ukázalo se, že celkově nejúčinnější je právě kombinace PLGA+MET, u které se prokázal razantní vliv nejen na produkci a pohyblivost spermií, ale i na zlepšení všech sledovaných parametrů rychlosti spermií. VAP rychlost se z počátečního stavu přibližně $110 \pm 20 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ po 48 h zvýšila na téměř $120 \pm 10 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ u skupin s CPE a PLGA, avšak u skupiny s PLGA+MET na téměř $130 \pm 5 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$. Účinek této kombinace se na VCL rychlost výrazně projevila po 96 h, kdy se počáteční průměrná rychlost $120 \pm 10 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ zvýšila na $130 \pm 5 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$. Průměrná VSL rychlost se z původních $85 \pm 15 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ po 48 h zvýšila na $90 \pm 10 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$. Průměrná koncentrace 11-ketotestosteronu se před injekcí pohybovala okolo $2,5 \pm 0,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Nejvýraznější pokles jsme po 48h zaznamenali rovněž u skupiny PLGA+MET. Jednoznačně jsme prokázali pozitivní vliv na dozrávání samčích gamet a jejich uvolňování.

Pozitivní účinek mikročastic se projevil i v druhém experimentu s jikernačkami. Použitím kombinace PLGA+MET ($20\mu\text{g GnRHa}\cdot\text{kg}^{-1}+20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) se podařilo dosáhnout ovulace u všech ryb. Oproti kontrole se doba latence zkrátila na 94h (o 42h méně). Po použití zvýšené silnější dávky ($40\mu\text{g GnRHa}\cdot\text{kg}^{-1}+20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) jsme dosáhli poloviční ovulace, avšak velmi uspokojivých výsledků oplozenosti $55,6 \pm 7,2$ % a líhivosti $77,68 \pm 16,7$ %. Touto koncentrací jsme dosáhli pozitivních výsledků i u absolutní a relativní plodnosti, kde hodnoty plodnosti převyšovaly nebo se rovnaly hodnotám kontroly. Použití samotného PLGA se neukázalo jako příliš efektivní, jež potvrzuje nutnost použití dopamin antagonisty.

Na závěr lze konstatovat, že jsme dokázali pozitivní vliv na dozrávání gamet samicích a částečně i samicích. Většina zjištěných hodnot je velmi uspokojivá, avšak stále je prostor pro zlepšení, přičemž se úspěch s jistotou nachází v ideální kombinaci GnRHa a dopamin antagonisty.

7 PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY

Abraham, M., 1988. Recent trends in research on induced spawning of fish in aquaculture. *Journal of Applied Ichthyology*, 4, 49-64.

Adams, B. A., Tello, J. A., Erchegeyi, J., Warby, C., Hong, D. J., Akinsanya, K. O., Mackie, G. O., Vale, W., Rivier, J. E., Sherwood, N. M., 2003. Six novel gonadotropin-releasing hormones are encoded as triplets on each of two genes in the protochordate, *Ciona intestinalis*. *Endocrinology*, 144, 1907-1919.

Aida, K., 1988. A review of plasma hormone changes during ovulation in cyprinid fishes. *Aquaculture*, 74, 11-21.

Babiak, I., Glogowski, J., Luczynski, M. J., Luczynski, M., 2008. Effect of individual variability on cryopreservation of northern pike, *Esox lucius* L., sperm. *Aquaculture Research*, Volume 28, Issue 3, 191-197.

Baiee, F. H., Haron A. W., Yusoff R. H., Omar, M. A., Yimer, N., Jeber, Z., Hammadi, S., Ahmedeltayeb, T. A., Fitri, W., Umar, M., 2017. Kinetic Motilities of Cryopreserved Bull Spermatozoa: Owing to the Effect of *Eurycoma longifolia* Jack Aqueous Extract.

Baruš, V., Oliva, O., 1995a. (Eds) *Mihulovci – Petromyzontes a Ryby – Osteichthyes* (1), Academia, Praha, 674.

Baruš, V., Oliva, O., 1995b. (Eds) *Mihulovci – Petromyzontes a Ryby – Osteichthyes* (2), Academia, Praha, 704.

Bentley, P. J., 1998. *Comparative Vertebrate Endocrinology*. Melbourne, Cambridge University Press, New York, 313-315.

Berka, R., Hamáčková, J., 1980. *Chov štiky a candáta. Studijní informace ÚVTIZ – Řízení živočišné výroby*, Praha, 80 s.

Billard, R., 1986. Spermatogenesis and dermatology of some teleost fish species (1). *Reproduction Nutrition Development*, 26 (4), pp. 877-920.

Billard, R., Fostier, A., Weil, C., Breton B., 1982. Endocrine control of spermatogenesis in teleost fish. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 39, 65-79.

Billard, R., Jalabert, B., 1972. Les cellules de Sertoli des poissons Téléosttéens. I. Etude ultrastructurale. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, 12, 19-32.

Billard, R., Marcel, J., 1980. Stimulation of spermiation and induction of ovulation in pike (*Esox lucius*). *Aquaculture*, Volume 21, Issue 2, 181-195.

Blömenrohr, M., Goos, H., Bogerd, J., Eidne, K., Willars, G., 2005. GnRH receptors in fish: Differences in structure-function relations between *mammalian* and *non-mammalian* GnRH receptors. *Hormones And Their Receptors In Fish Reproduction*, 4, 40.

Blomenröhr, M., Ter Laak, T., Kuh, R., Bayermann, M., Hund, E., Bogerd, J., Leurs, R., 2002. Chimaeric gonadotropin-releasing hormone (GnRH) peptides with improved affinity for the catfish (*Clarias gariepinus*) GnRH receptor. *Biochemical and biophysical research communications*, 187, 127-134.

Bondarenko, V., Podhorec, P., Svinger, V. W., Policar, T., 2015. Evaluation of Treatments for Induction of Ovulation in Northern Pike (*Esox lucius* L.), *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 15, 575-581.

Bosma, P. T., Rebers, F. E., Van Dijk, W., Willems, P. H., Henk, J. T., Schulz, R. W., 2000. Inhibitory and stimulatory interactions between endogenous gonadotropin-releasing hormones in the African catfish (*Clarias gariepinus*). *Biology of reproduction*, 62, 731-738.

Callard, G. V., 1996. Endocrinology of Leydig cells in *nonmammalian* vertebrates. In: Payne, A. H., Hardy, M.P., Russel, L.D. (Eds.), *The Leydig Cell*. Cache River Press, Vienna, IL, USA, pp. 308-311.

Cardinaud, B., Gilbert, J. M., Liu, F., Sugamori, K. S., Vincent J. D., Niznik, H. B., Vernier, P., 1998. Evolution and origin of the diversity of dopamine receptors in vertebrates. *Advances in Pharmacology*, 42, 936-940.

Cejko, B. I., Krejszeff, S., Żarski, 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.

Cejko, B. I., Sarosiek, B., Krejszeff, S., Judycka, S., Szczepkowski, M., 2016. Effects of different stripping methods of female and activation medium on fertilization success in northern pike (*Esox lucius*), *Czech J. Anim. Sci.*, 61, 481–486.

Čítek, J., Krupauer, V., Kubů, F., 1998. *Rybníkářství*, 3. vyd. Informatorium, Praha, 309.

Clearwater, S. J., Crim, L. W., 1998. Gonadotropin releasing hormone-analogue treatment increases sperm motility, seminal plasma pH and sperm production in yellowtail flounder *Pleuronectes ferrugineus*. *Fish Physiology and Biochemistry*, Volume 19, Issue 4, 349-357.

Copeland, P. A., Thomas, P., 1989. Control of gonadotropin release in Atlantic Croaker; evidence for a lack of dopaminergic inhibition. *Gen. comp. Endocrinol.*, 74, 474-483.

Cyr, D. G., Eales, J. G., 1996. Interrelationships between thyroidal and reproductive endocrine systems in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 6, 165-200.

De Leeuw, R., Habibi, H. R., Nahorniak, C. S., Peter, R. E., 1989. Dopaminergic regulation of pituitary gonadotropin-releasing hormone receptor activity in the goldfish (*Carassius auratus*). *Journal of Endocrinology*, 121, 239-247.

De Montalembert, G., Bry, C., Billard, R., 1978. Control of reproduction in northern pike. Symposium on Selected Coolwater Fishes of North America, Saint-Paul, Minnesota, United States.

Donaldson, E. M., 1996. Manipulation of reproduction in farmed fish. *Animal Reproduction Science*, 42, 381-392.

Drori, S., Ofir, M., Levavi-Sivan, B., Yaron Z., 1994. Spawning induction in common carp (*Cyprinus carpio*) using pituitary extract or GnRH superactive analogue combined with metoclopramide: analysis of hormone profile, progress of oocyte maturation and dependence on temperature. *Aquaculture*, Volume 119, Issue 4, 393-407.

Dubois, E. A., Zandbergen, M. A., Peute, J., Goos, H. J. 2002. Evolutionary development of three gonadotropin-releasing hormone (GnRH) systems in vertebrates. *Brain research bulletin*, 57, 413-418.

Dubský K., 1998. Základy chovu vedlejších druhů ryb, Institut výchovy a vzdělávání Ministerstva zemědělství ČR, 34.

Dubský K., Kouřil J., Šrámek V., 2003. *Obecné rybářství*, Informatorium, Praha, 164.

Dufour, S., Weltzien, F. A., Sebert, M. E., Le Belle, N., Vidal B., Vernier, P., Pasqualini, C., 2005. Dopaminergic inhibition of reproduction in teleost fishes: ecophysiological and evolutionary implications. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1040, 9-21.

Fernald, R. D., White, R. B., 1999. Gonadotropin-releasing hormone genes: phylogeny, structure, and functions. *Frontiers in neuroendocrinology*, 20, 224-240.

Fink, G., 1988. Gonadotropin secretion and its control. The physiology of reproduction, 1, 1349-1377.

Formies, M. A., Camillo, M., Mañanós, E., Sorbera, L. A., Zohar, Y., Zanuy, S., 2003. Relative potency of the forms of GnRH and their analogs on LH release in sea bass. Journal of fish biology, 63, 73-89.

Füllner, G., Pfeifer, M., Langer, N., 2007. Karpfenteichwirtschaft, Bewirtschaftung von Karpfenteichen, Gute fachliche Praxis. Sächsische Landesanstalt für Landwirtschaft, Dresden, Germany, 129.

Goetz, F. W., 1983. Hormonal control of oocyte final maturation and ovulation in fishes. Fish physiology, 9, 117-170.

Guilgur, L. G., Moncaut, N. P., Canario, A. V., Somoza, G. M., 2006. Evolution of GnRH ligands and receptors in gnathostomata. Comparative Biochemistry and Physiology: Molecular & Integrative Physiology, 144, 272-283.

Hanel, L., Lusk, S., 2005. Ryby a mihule České republiky, rozšíření a ochrana, ČSOP Vlašim, 448.

Hartman, P., Regenda, J., 2014. Praktika v rybníkářství. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Vodňany, 261.

Holčík, J., 1998. Ichtyológia. Príroda, Bratislava, 315 s.

Hotchkiss, J., Knobil, E., 1994. The menstrual cycle and its neuroendocrine control. The Physiology of reproduction, 2, 711-749.

Hulák, M., Rodina, M., Linhart, O., 2008. Charakteristika vytřeného a testikulárního spermatu štiky obecné (*Esox lucius* L.): Motilita a rychlost spermií. Bulletin VÚRH Vodňany, 3.

Chang, J. P., Jobin, R. M., Wong, A. O. L., 1993. Intracellular mechanisms mediating gonadotropin and growth hormone release in the goldfish, *Carassius aureus*. Fish Physiology and Biochemistry, 11, 25-33.

Chang, J. P., Peter, R. E., Crim, L. W., 1984. Effects of dopamine and apomorphine on gonadotropin release from transplanted pars distalis in goldfish. General and comparative endocrinology, 55, 347-350.

Chen, C., Fernald, R. D., 2008. GnRH and GnRH receptors: distribution, function and evolution. Journal of Fish Biology, 73, 1099-1120.

- Idler, D. R., Bitners, I. I., Schmidt, P. J., 1961. 11-Ketotestosterone: An androgen for sockeye salmon. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 39 (11), 1737-1742.
- Jelínek, P., Koudela, K., Doskočil, J., Illek, J., Kotrbáček, V., 2003. Fyziologie hospodářských zvířat. MZLU Brno, 1, 414.
- Joy, K. P., Tharakan, B., 1999. Induced Spawning of the Indian Catfish, *Heteropneustes fossilis*, by GnRH Analogue Alone or in Combination with Dopamine-Affecting Drugs. *Journal of applied Aquaculture*, Volume 9, Issue 4, 23-32.
- Kah, O., Lethimonier, C., Somoza, G., Guilgur, L. G., Vaillant, C., Lareyre, J. J., 2007. GnRH and GnRH receptors in *metazoa*: a historical, comparative, and evolutive perspective. *General and comparative endocrinology*, 153, 346-364.
- Kawauchi, H., Suzuki, K., Itoh, H., Swanson, P., Naito, N., Nagahama, Y., Nozaki, M., Nakai, Y., Itoh, S., 1989. The duality of fish gonadotropins *Fish Physiol. Biochem*, 7,29-38.
- Kebabian, J. W., Calne, D. B., 1979. Multiple receptors for dopamine. *Nature*, 277, 93-96.
- Kime, D. E., 1993. Classical and non-classical reproductive steroids in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 160-180.
- King, J. A., Millar, R. P., 1995. Evolutionary aspects of gonadotropin-releasing hormone and its receptor. *Cellular and molecular neurobiology*, 15, 5-23.
- Kobayashi, M., Aida, K., Hanyu, I., 1989. Involvement of steroid hormones in this preovulatory gonadotropins surge in female goldfish. *Fish Physiology and Biochemistry*, 7(1), 141-146.
- Kouřil, J., Barth, T., 1981. The achievement of egg ovulation in artificial spawning of tench (*Tinca tinca* L.) using LH-RH. *Bul. VÚRH Vodňany*, 17,13-18.
- Kouřil, J., Hamáčková, J., 1975. Plodnost štiky obecné (*Esox lucius* L.) z rybníčního chovu. *Živoč. výroba*, 20 (11): 841- 849.
- Kostomarov, B., 1958. *Rybářství, ČSAV v SZN*, 353.
- Król, R., Kowalski, R. K., Hliwa, P., Dietrich, G. J., Stabiński, R., Ciereszko, A., 2009. The effects of commercial preparations containing two different GnRH analogues and dopamine antagonists on spermiation and sperm characteristics in the European smelt *Osmerus eperlanus* (L.). *Aquaculture*, Volume 286, Issues 3-4, 328-331.

Krupauer, V., Pekař, C., 1965. Rozmnožování štiky obecné v Lipenské údolní nádrži. Práce VÚRH Vodňany, 1965 (5), 105- 143.

Kucharczyk D., Kujawa, R., Mamcarz, A., Skrzypczak, A., Wyszomirska, E., 2008. Induced spawning in perch, *Perca fluviatilis* L., using FSH + LH with pimozide or metoclopramide. *Aquaculture research* 29 (2), 131-136.

Lahnsteiner F., Weismann t, Partner R. A. 1998. An efficient method for cryopreservation of testicular sperm from the northern pike (*Esox lucius*). *Aquac. Res.* 29, 341- 347.

Le Gac, F., Blaise, O., Fostier, A., Le Bail, P. Y., Loir, M., Mourot, B., Weil, C., 1993. Growth hormone (GH) and reproduction: a review. *Fish Physiology and Biochemistry*, 11, 219-232.

Lethimonier, C., Madigou, T., Muñoz-Cueto, J. A., Lareyre, J. J., Kah, O., 2004. Evolutionary aspects of GnRHs, GnRH neuronal systems and GnRH receptors in teleost fish. *General and comparative endocrinology*, 135, 1-16.

Levavi-Zermonsky, B., Yaron, Z., 1986. Changes in gonadotropin and ovarian steroids associated with oocytes maturation during spawning induction in the carp. *General and comparative endocrinology*, 62, 89-98.

Lindroth, A., 1947. Times of activity of freshwater fish spermatozoa in relation to temperature. *Zool. Bird. Upps.*, 25, 165- 168.

Linhart, O., 1985. Použití oplozovacích roztoků při výtěru ryb. Edice Metodik, VÚRH, Vodňany, č.17, 13 s.

Linhart, O., Pokorný, J., 1984. Hodnocení čerstvého spermatu ryb. Edice Metodik, VÚRH, Vodňany, č.14, 13 s.

Lusk, S., Baruš, V., Vostradovský, J., 1992. Ryby v našich vodách, Academia, Praha, 212.

Mañanós, E., Duncan, N., Mylonas, C., 2009. Reproduction and control of ovulation, spermiation and spawning in cultured fish. *Methods in reproductive aquaculture. Marine and Freshwater Species*, CRC Press, Boca Raton, 3-80.

Mareš, J., Burleová, J., 1983. Rybářská technologie II. Institut výchovy a vzdělávání Ministerstva zemědělství v Praze, 256.

Matty, A. J., 1985. *Fish Endocrinology*. Timber Press, Portland, Oregon, USA.

- Matsuo, H., Baba, Y., Nair, R. M., Arimura, A., Schally, A. V., 1971. Structure of the porcine LH- and FSH- releasing hormone I. The proposed amino acid sequence. Biochemical and biophysical research communications, 43, 1334-1339.
- Miyamoto, K., Hasegawa, Y., Nomura, M., Igarashi, M., Kanagawa, K., Matsuo, H., 1984. Identification of the second gonadotropin-releasing hormone in chicken hypothalamus: evidence that gonadotropin secretion is probably controlled by two distinct gonadotropin-releasing hormones in avian species. Proceedings of the National Academy of Sciences, 81, 3874-3878.
- Mylonas, C. C., Zohar, Y., 2001. Use of GnRHa- delivery systems for the control of reproduction in fish. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 10, 463-491.
- Mylonas, C. C., Zohar, Y., 2007. Promoting oocyte maturation, ovulation and spawning in farmed fish. The Fish Oocyte, 437-474.
- Nagahama, Y., Yoshikimi, M., Yamashita, M., Tokumoto, T., Katsu, Y., 1995. Regulation of Oocyte Growth and Maturation in Fish. Current topics in developmental biology, 30, 103-145.
- Navas, J. M., 1995. Do gonadotropin-releasing hormone neurons express estrogen receptors in the rainbow trout? A double immunohistochemical study. Journal of Comparative Neurology, 363, 461-474.
- Nóbrega, R. H., Batlouni, S. R., Franca, L. R., 2009. An overview of functional and stereological evaluation of spermatogenesis and germ cell transplantation in fish. Fish Physiol. Biochem. 35, 197-206.
- Ohta, H., Tanaka, H., 1997. Relationship between serum levels of human chorionic gonadotropin (hCG) and 11-ketotestosterone after a single injection of hCG and induced maturity in the male Japanese eel, *Anguilla japonica*. Aquaculture 153(1), 123-134.
- Okubo, K., Nagahama, Y., 2008. Structural and functional evolution of gonadotropin-releasing hormone in vertebrates. Acta Physiologica, 193, 3-15.
- Pankhurst, N. W., 1998. Reproduction. In: Biology of farmed fish (ed. Black, K. D, Pickering, A. D). Academy Press, Sheffield, 1-26.
- Pecha, O., Kouřil, J., Pecha, O., 1992. Induced ovulation in pike (*Esox lucius*) females using carp pituitary and two synthetic analogues of Gn-RH. Proceedings of Scientific Conference on Fish Reproduction '92, 2-4 March 1992, Vodňany, Czech Republic, pp. 59-60.

Peter R. E., Lin, H. R., Van der Kraak, G., 1988. Induced ovulation and spawning of cultured freshwater fish in China: Advances in application of GnRH analogues and dopamine antagonists. *Aquaculture*, volume 74, Issues 1-2, 1-10.

Peter, R. E., Lin, H. R., Van Der Kraak, G., Little, M., 1993. Releasing hormones, dopamine antagonists and induced spawning. *Recent Advances in Aquaculture*, 4, 25-30.

Peter, R. E., Yu, K. L., 1997. Neuroendocrine regulation of ovulation in fishes : basic and applied aspects. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 7, 173 – 197.

Podhorec, P., Kouřil, J., 2009. Induction of final oocyte maturation in *Cyprinidae* fish by hypothalamic factors: a review. *Veterinární Medicína*, 54, 97-110.

Rainis, S., Ballestrazzi, R., 2005. The control of reproduction in finfish species through GnRH treatments. *Italian Journal of Animal Science*, 4, 345-353.

Randák, T., Slavík, O., Kubečka, J., Adámek, Z., Horký, P., Turek, J., Vostradovský, J., Hladík, M., Peterka, J., Musil, J., Prchalová, M., Jůza, T., Kratochvíl, M., Boukal, D., Vašek, M., Andreji, J., Dvořák, P., 2015. *Rybářství ve volných vodách*. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Vodňany, 434.

Rather, M. A., Sharma, R., Gupta, S., Ferosekhan, S., Ramya, V. L., Jadhao, S. B., 2013. Chitosan-Nanoconjugated Hormone Nanoparticles for Sustained Surge of Gonadotropins and Enhanced Reproductive Output in Female Fish. *PLoS ONE* 8(2), Valentin Ceña, Universidad de Castilla-La Mancha, Spain.

Reiser, F., 1996. *Ryby našich vod*, Brázda, Praha, 29.

Reynolds, B., Berryman, J., 1993. *Pike on the fly: The flyfishing guide to northern, tigers and muskies*. Printed in the United States, Johnson Printing Company.

Scott, W. B., Crossman, E. J., 1985. *Freshwater Fishes of Canada*. The Bryant Press Limited, 367.

Sealfon, S. C., Weinstein, H., Millar, R. P., 1997. Molecular mechanisms of ligand interaction with the gonadotropin-releasing hormone receptor. *Endocrine reviews*, 18, 180-205.

Senthilkumaran, B., Joy, K. P., 1995. Changes in hypothalamic catecholamines, dopamine β hydroxylase, and phenylethanolamine-N-transferase in the catfish, *Heteropneustes fossilis* in relation to season, raised photoperiod, and temperature, ovariole, and estradiol-17 β replacement. *General and Comparative Endocrinology*, 97, 121-134.

Sherwood, N. M., Parker, D. B., McRory, J. E., Lescheid, D. W., 1994. Molecular evolution of growth hormone-releasing and gonadotropin-releasing hormone. *Fish Physiology*, Academic Press, 3-66.

Sherwood, N., Eiden, L., Brownstein, M., Spiess, J., Rivier, J., Vale, W., 1983. Characterization of a teleost gonadotropin-releasing hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80, 2794-2798.

Schulz, R. W., de Franca, L. R., Lareyre, J. J., Le Gac, F., Chiarini-Garcia, H., Nóbrega, R.H., Miura, T., 2010. Spermatogenesis in fish. *General and Comparative Endocrinology* 165, 390-411.

Schulz, R. W., Menting, S., Bogerd, J., Franca, L.R., Vilela, D.A.E., Godinho, H.P., 2005. Sertoli cell proliferation in the adult testis: evidence from two fish species belonging to different orders. *Biol. Reprod.* 73, 891-898.

Steven, C., 2000. Studies on the GnRH-GtH system of female striped bass (*Morone saxatilis*): effects of GnRH agonist therapy and comparison of reproductive endocrine parameters between wild and captive fish. *Marine Estuarine and Environmental Sciences*. University of Maryland, College Park.

Steven, C., Gothilf, Y., Holland, M. C., Stubblefield, J., Mylonas, C. C., Zohar, Y., 2000. Differential expression of the free GnRH genes in wild and captive striped bass, *Morone saxatilis* in response to natural and hormonally induced maturation. In *International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish*, 6.

Szabó, T., 2001. Hormonally Induced Ovulation of Northern Pike via Sustained-Release Vehicles. *North American Journal of Aquaculture*, Volume 63, Issue 2, 137-143.

Szabó, T., 2013. Ovulation induction in northern pike *Esox lucius* L. using different GnRH analogues, Ovaprim, Dagin and carp pituitary. Department of Fish Culture, Faculty of Agricultural and Environmental Sciences, Szent István University, Gödöllő, Hungary.

Szabó, T., 2008. Use of Carbopol resin for carp pituitary administration improves the fertilization percentage of northern pike (*Esox lucius* Linnaeus) eggs in commercial hatcheries. *Hydrobiologia*, Volume 601, Issue 1, 91-97.

Szabó, T., Ditrói, B., Szabó, K., Bokor, Z., Urbányi, B., 2014. Comparison of the Efficiency of Common Carp and Silver Carp Pituitary in the Breeding of Common Carp (*Cyprinus carpio*) and Northern Pike (*Esox lucius*). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, Vol 14, Num 3, 841-844.

Šimek, Z., 1954. Rybářství v tekoucích vodách. Státní zemědělské nakladatelství, Praha, 443.

Tamaru, C. S., Carlstrom Trick, C., FitzGerald, W. J., Ako, H., 1996. Induced final maturation and spawning of the marbled grouper *Epinephelus microdon* captured from spawning aggregations in the Republic of Palau, Micronesia. *Journal of the World Aquaculture Society*, 27, 363-372.

Taranger, G. L., Carrillo, M., Schulz, R. V., Fontaine, P., Zanuy S., Felip, A., Weltzien, F., Dufour S., Karlsen, Ø., Norberg, B., Andersson, E., Hansen, T., 2010. General and Comparative Endocrinology 165, 483–515.

Toner E. D., Lawler G. H. 1969. Synopsis of the Biological Data on the Pike *Esox lucius* (Linnaeus 1758). FAOFisheries Synopsis (30) Rev. 1. Rome, 29.

Trudeau, V. L., Peter, R. E., 1995. Functional interactions between neuroendocrine systems regulativ GTH-II release. *Reproductive Physiology of Fish*, 44-48.

Van der Kraak, G., 1983. Effects of LH-RH and des-Gly10(D-Ala)LH-RH ethylamide on plasma gonadotropin levels and oocyte maturation in adult females coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Gen.Comp.Endocrinol.*, 49:470-476.

Van Der Kraak, G., Donaldson, E. M., Chang, J. P., 1986. Dopamine involvement in the regulation of gonadotropin secretion in coho salmon. *Canadian Journal of Zoology*, 64 (6), 1245-1248.

Van der Kraak, G., Pankhurst, N. W., Peter, R. E., Lin, H. R., 1989. Lack of antigenicity of human chorionic gonadotropin in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) and goldfish (*Carassius auratus*). *Aquaculture*, 78, 81-86.

Vysloužil, J., Dvořáčková, K., Kejdušová, M., Rabišková, M., 2013. Preparation of Medicinal Microparticles by Solvent Evaporation Method, Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno.

Watanabe, W. O., Ellis, E. P., Ellis, S. C., Chaves, J., Manfredi, C., Hagood, R. W., Sparsis, M., Arneson, S., 1998. Artificial propagation of mutton snapper *Lutjanus analis*, a new candidate marine fish species for aquaculture. *Journal of the World Aquaculture Society* 29, 176-187.

White, R. B., Eisen, J. A, Kasten, T. L., Fernald, R. D., 1998. Second gene for gonadotropin-releasing hormone in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, 305-309.

Wischke, Ch., Schwendeman, P., 2008. Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, Volume 364, Issue 2, 298-327.

Yaron, Z., 1995. Endocrine control of gametogenesis and spawning induction in the carp. *Aquaculture*, 129, 49-73.

Yaron, Z., Gal G., Melamed, P., Rosenfeld, H., Elizur, A., Levavi-Sivan, B., 2003. Regulation of fish gonadotropins. *International review of cytology*, 255, 131-185.

Yaron, Z., Levavi-Sivan, B., 2006. Fish reproduction. *Physiology of Fishes*, 345-388.

Yu, K. L., Peter, R. E., 1992. Adrenergic and dopaminergic regulation of gonadotropin releasing hormone release from goldfish preoptic-anterior hypothalamus and pituitary *in vitro*. *General and Comparative Endocrinology*, 85, 138-146.

Zohar, Y., 1988. Gonadotropin releasing hormone in spawning induction in teleosts: basic and applied considerations. *Colloques de INTRA*.

Zohar, Y., Mylonas, C. C., 2001. Endocrine manipulation of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture*, 197, 99-136.

Zohar, Y., Pagelson, G., Gothilf, Y., Dickhoff, W. W., Swanson, P., Duguay, S., Gombotz, W., Kost, J., Langer, R., 1990. Controlled release of gonadotropin releasing hormones for the manipulation of spawning in farmed fish. In *Proceedings of the International Symposium on Controlled Release of Bioactive Material*, 17, 51-52.

Zohar, Y., Tosky, M., Pagelson, G., Finkelman, Y., 1989. Induction of spawning in the gilthead seabream, *Sparus aurata*, using [D-Ala⁶-Pro⁹NEt]-LHRH: Comparison with the use of HCG. *The Israeli Journal of Aquaculture Bamidgeh*, 41, 105-113.

8 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha č.1: Anestezie jikernaček štiky obecné (*Esox lucius*)

Příloha č.2: Odběr spermatu

Příloha č.3: Osemenění směsného vzorku jiker pomocí testikulárního spermatu

Příloha č.4: Techniky výtěru

Příloha č.5: Oplození jiker

Příloha č.6: Odlepkování jiker

Příloha č.7: Injikace do hřbetní svaloviny

Příloha č.8: Inkubace jiker v Chasseových láhvích

Příloha č.9: Rückel – Vackovy aparáty

Příloha č.10: Rozplavaný váčkový plůdek

Příloha č.11: Detail embryí

Příloha č.12: Příprava hormonálních preparátů

Příloha č.13: Vzorky jiker

Příloha č.14: Inkubace jiker v inkubátoru

Všechny fotografie pocházejí z archivu autora.

9 PŘÍLOHY

Příloha.č.1: Anestezie jikernaček štiky obecné (*Esox lucius*)



Příloha č.2: Odběr spermatu



Příloha č.3: Osemenění směšného vzorku jiker pomocí testikulárního spermatu



Příloha č.4: Techniky výtěru: a) v sedě; b) ve stoje





Příloha č.5: Oplození jiker



Příloha č.6: Odlepkování jiker



Příloha č.7: Injikace do hřbetní svaloviny



Příloha č.8: Inkubace jiker v Chasseových láhvích



Příloha č.9: Rückel – Vackovy aparáty



Příloha č.10: Rozplavaný váčkový plůdek



Příloha č.11: Detail embryí



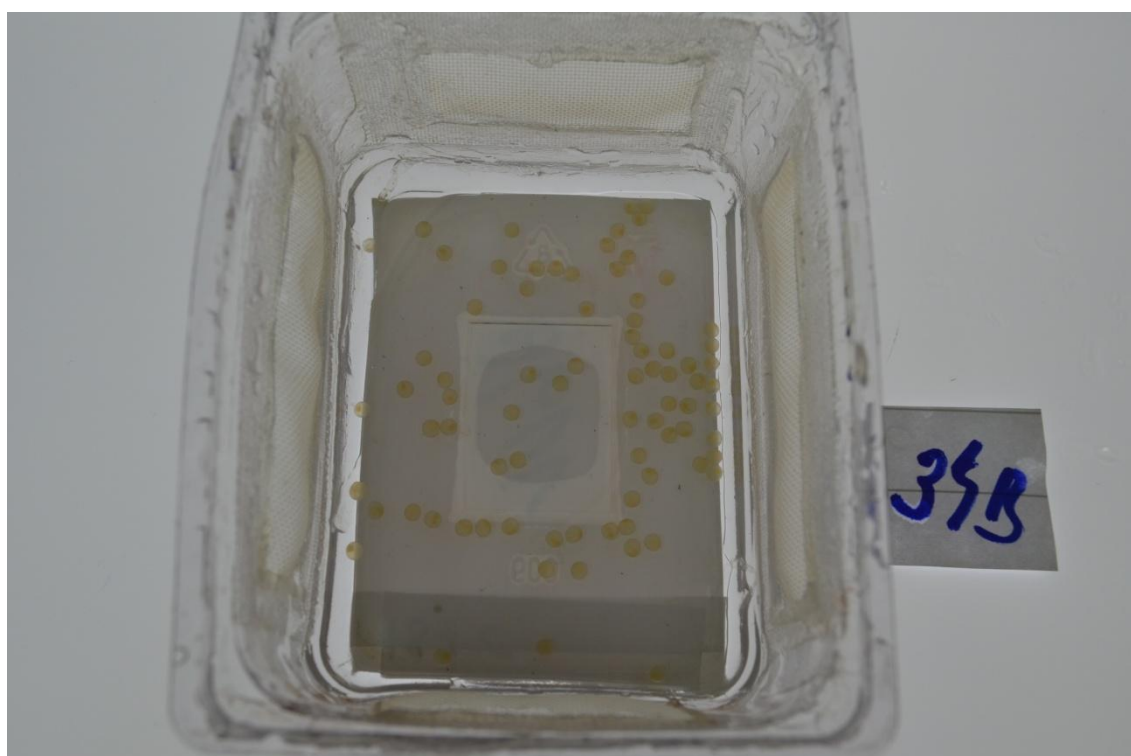
Příloha č.12: Příprava hormonálních preparátů



Příloha č.13: Vzorky jiker



Příloha č.14: Inkubace jiker v inkubátoru



10 ABSTRAKT

Tato bakalářská práce byla zaměřena na identifikaci druhově optimálních přípravků na bázi PLGA mikročástic z hlediska délky a intenzity uvolňování a složení účinné látky (GnRHa, metoclopramide), která by našla využití v umělé reprodukci vybraných druhů ryb – štiky obecné (*Esox lucius*).

V podmínkách Experimentálního rybochovného pracoviště, FROV JČU ve Vodňanech a tábořské Štičí líhně ESOX s.r.o. probíhal první dvoutýdenní experiment, z něhož jsme dosáhly požadovaných výsledků u mlíčáků. O rok později se experiment odehrával opět v Táboře a nově v líhni v Mydlovarech. Tentokrát se soustředil na jikernačky. Během prvního výzkumu jsme dosáhli uspokojivých výsledků a potvrdilo se, že jdeme správným směrem. Jako nejúčinnější se prokázala kombinace GnRH spolu s dopamin antagonistou Metoclopramidem. U mlíčáků jsme nejlepších výsledků dosáhli aplikací $20\mu\text{g GnRHa.kg}^{-1}+20\text{ mg MET.kg}^{-1}$, kde jsme dosáhli pozitivních výsledků u všech sledovaných parametrů – zvýšený objem vyprodukovaného mlíčí, zvýšená pohyblivost a rychlost spermií, snížená koncentrace 11-ketotestosteronu. Během druhého experimentu zaměřeného na jikernačky jsme prokázali, že kombinace GnRH+MET v koncentraci $20\mu\text{g GnRHa.kg}^{-1}+20\text{ mg MET.kg}^{-1}$ má pozitivní vliv na dosažení ovulace, snížení doby latence a vyšší koncentrace $40\mu\text{g GnRHa.kg}^{-1}+20\text{ mg MET.kg}^{-1}$ i na oplozenost a líhivost jiker, avšak za cenu nižší plodnosti.

Výsledky experimentů ukazují, že použitím kombinace a správné koncentrace GnRH s dopamin antagonistou je možné indukovat dozrávání gamet mlíčáku i jikernaček štiky obecné. U jikernaček však stále zůstává prostor pro zlepšení.

Klíčová slova: štika obecná, PLGA, kapří hypofýza, ovulace, hormonální stimulace, dopamin antagonist

11 ABSTRACT

This bachelor thesis was focused on identification of species-optimized preparations based on PLGA microparticles in terms of length and intensity of release and composition of active substance (GnRH_a, metoclopramide), which would be used in artificial reproduction of selected fish species - pike (*Esox lucius*).

Under the conditions of the Experimental Fish Farm, FROV JČU in Vodňany and the Tábor Štičí líheň ESOX s.r.o. the first two-week experiment was conducted to achieve the desired results, which were achieved with males of pike. A year later, the experiment took place again in Tabor and newly in the hatchery in Mydlovary. This time we focused on females of pike. During the first research, we have achieved satisfactory results and confirmed that we are going in the right direction. Combination of GnRH with dopamine antagonist Metoclopramide has been shown to be most effective. The best results were achieved by application of 20µg GnRH_a.kg⁻¹ + 20mg MET.kg⁻¹, where we achieved positive results in all parameters - increased milt production volume, increased sperm motility and speed, decreased 11-ketotestosterone concentration. During the second experiment with female, we showed that the combination of GnRH + MET at a concentration of 20µg GnRH_a.kg⁻¹ + 20mg MET.kg⁻¹ has a positive effect on ovulation achievement, latency time reduction and higher concentration of 40µg GnRH_a.kg⁻¹ + 20 mg MET.kg⁻¹ also for fertilization and hatching of eggs, but at the cost of lower fecundity.

The results of the experiments show that by using this combination and the correct concentration of GnRH with the dopamine antagonist it is possible to induce maturation of the gametes of male as well as female of pike fish. However, there is still room for improvement of female.

Keywords: northern pike, PLGA, carp pituitary extract, ovulation, hormonal stimulation, dopamin antagonist