

UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA

**VPLIV ANDROGENE DEPRIVACIJE PRI MERJASCIH NA
HISTOKEMIČNE IN MORFOMETRIČNE LASTNOSTI
SKELETNOMIŠIČNIH VLAKEN**

**EFFECT OF ANDROGEN DEPRIVATION IN BOARS ON THE
HISTOCHEMICAL AND MORPHOMETRIC CHARACTERISTICS OF
SKELETAL MUSCLE FIBRES**

Anja Erbežnik

Ljubljana 2020

UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA

UDK 636.4.082.4:612.744:611.018.62:57.086:57.087.1(042.2)

**VPLIV ANDROGENE DEPRIVACIJE PRI MERJASCIH NA
HISTOKEMIČNE IN MORFOMETRIČNE LASTNOSTI
SKELETNOMIŠIČNIH VLAKEN**

**EFFECT OF ANDROGEN DEPRIVATION IN BOARS ON THE
HISTOCHEMICAL AND MORPHOMETRIC CHARACTERISTICS OF
SKELETAL MUSCLE FIBRES**

Anja Erbežnik

Delo je bilo pripravljeno v skladu s pravilnikom o podeljevanju Prešernovih nagrad študentom pod mentorstvom prof. dr. Milke Vrecl Fazarinc na Inštitutu za predklinične vede Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani in somentorstvom prof. dr. Marjete Čandek-Potokar na Kmetijskem inštitutu Slovenije.

Ljubljana 2020

POVZETEK

Ključne besede: prašiči; samec; orhiektomija – metode; skeletna mišična vlakna – metabolizmi; težke verige miozina – genetika – metabolizem; mišična kontrakcija – fiziologija; histocitokemija; biometrija; verižna reakcija s polimerazo; primerjalne študije

V nalogi smo primerjali histomorfometrične lastnosti dveh kontraktilno-presnovno različnih skeletnih mišic, tj. najdaljše hrbtne mišice (LD, *m. longissimus dorsi*) in poltrnove mišice glave (SSC, *m. semispinalis capitis*), med imunokastrati (IC), merjasci (EM) in kirurškimi kastrati (SC). Predvidevali smo vpliv dolžine androgene deprivacije med proučevanimi spolnimi kategorijami na delež, histomorfometrične lastnosti in preobrazbo mišičnih vlaken. Opravili smo encimsko in imunohistokemično razvrstitev ter morfometrično analizo mišičnih vlaken, s pomočjo analize qPCR pa smo ocenili izražanje izbranih genov, povezanih s kontraktilno-presnovnimi lastnostmi vlaken, kakovostjo mesa in preobrazbo glikolitičnih vlaken v oksidativna. Potrdili smo značilne histokemične in morfometrične lastnosti vlaken LD in SSC ter tudi značilen vzorec izražanja proučevanih genov na ravni mRNA z izjemo Gα13. V LD prevladujejo glikolitična vlakna tipa IIb, v SSC pa oksidativna vlakna tipa I in II. Histokemično v SSC nismo identificirali čistih vlaken IIb, kar se sklada z analizo qPCR, ki kaže na okoli 1000-krat nižjo raven mRNA za težko miozinsko verigo (MyHC) IIb v primerjavi z LD. Vpliv razlik med hormonskim (androgenim) statusom živali je v kemični sestavi mišic viden predvsem med SC in EM, vpliv imunokastracije (kratkotrajne androgene deprivacije) pa v spremembri morfometričnih lastnosti oksidativnih vlaken v SSC in izražanju presnovnega encima heksokinaze 2 (HK2). Vpliva na izražanje Gα13 nismo ugotovili, vendar pozitivna korelacija med izražanjem Gα13 in receptorjem, aktiviranim s proliferatorjem peroksisomov γ (PPARγ) v LD in z PPARγ in koaktivatorjem 1 alfa PPARγ (PGC-1α) v SSC, potrjuje povezavo med izražanjem Gα13 in lipidno presnovo, značilno za oksidativna vlakna. Naši rezultati potrjujejo, da kratkotrajna androgena deprivacija z imunokastracijo vpliva na morfometrične lastnosti oksidativnih vlaken tipa I in da se ta vpliv bolj izraža v SSC kot v LD. Vplivi dolgotrajne androgene deprivacije (kiruška kastracija) se kažejo v povečanem deležu oksidativnih SDH++ pozitivnih vlaken v LD in znižanem izražanju HK2 v SSC v primerjavi z IC.

SUMMARY

Keywords: swine; male; orchiectomy – methods; muscle fibers, skeletal – metabolism; heavy myosin chains – genetics – metabolism; muscle contraction; histocytochemistry; biometry; polymerase chain reaction; comparative study

The histomorphometric properties of two skeletal muscles with distinctive contractile and metabolic characteristics, i.e., the *m. longissimus dorsi* (LD) and *m. semispinalis capitis* (SSC), were compared between immunocastrates (IC), entire males (EM), and surgical castrates (SC). We hypothesised that differences in androgen deprivation length among these sex categories affect the histochemical and morphometric profiles of myofibers and their transformation. We performed enzyme/immunohistochemical classification and morphometric analysis of myofibers and analysed the relative expression of selected genes related to myofiber contractile and metabolic properties, meat quality, and myofiber transformation. Histochemical analysis confirmed the distinctive histomorphometric profile of the LD and SSC myofibers and the characteristic expression pattern of the studied genes at the mRNA level, except for *Gα13*. Type IIb glycolytic myofibers predominate in the LD, whereas type I and II oxidative myofibers prevail in the SSC. Pure IIb myofibers were not identified in the SSC, which was consistent with qPCR analysis showing approximately 1000-fold lower expression of the myosin heavy chain (MyHC) IIb isoform than that in the LD. Hormonal (androgen) status differences were associated with changes in muscle chemical composition, mainly between SC and EM. Immunocastration (short-term androgen deprivation) primarily affected the morphometric properties of oxidative myofibers in the SSC and the expression of genes involved in skeletal muscle metabolism, i.e., hexokinase 2 (HK2); in contrast, that of *Gα13* did not change. However, a positive correlation between *Gα13* and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR γ) in LD and PPAR γ and PPAR γ coactivator 1-alpha (PGC-1 α) in SSC suggests an association between *Gα13* expression and lipid metabolism in oxidative myofibers. Our results show that short-term androgen deprivation by immunocastration affects the morphometric properties of type I oxidative fibres and that this effect is more pronounced in the SSC than in the LD. In contrast, long-term androgen deficiency (surgical castration) affects the proportion of oxidative SDH ++ positive fibers in LD and expression of HK2 in SSC compared to IC.

KAZALO VSEBINE

POVZETEK	IV
SUMMARY	V
KAZALO SLIK.....	VIII
KAZALO GRAFOV	IX
KAZALO TABEL.....	X
RAZLAGA KRATIC	XI
1 UVOD	4
2 PREGLED LITERATURE	6
2.1 PROBLEMATIKA KIRURŠKE KASTRACIJE	6
2.2 ALTERNATIVNE METODE KASTRACIJE	7
2.3 HISTOLOŠKA ZGRADBA SKELETNE MIŠČNINE	10
2.3.1 Zgradba in krčljivi elementi miščnega vlakna	10
2.3.1.1 Sestava aktinskih in miozinskih nitk.....	12
2.3.2 Razvoj miščnih vlaken	14
2.3.3 Kontraktilo- presnovne lastnosti in klasifikacija miščnih vlaken	16
2.3.4 Vpliv različnih dejavnikov na kontraktilno-presnovni in morfometrični profil miščnih vlaken	17
2.3.4.1 Vpliv spola.....	17
2.3.4.2 Vpliv androgene deprivacije pri prašičih.....	17
2.3.4.3 Geni povezani s presnovnim fenotipom in preobrazbo miščnih vlaken	18
3 MATERIALI IN METODE	19
3.1 PODATKI O ŽIVALIH IN VZORCIH MIŠIC	19
3.2 METODE	21
3.2.1 Določanje kemične sestave mišic.....	21
3.2.2 Encimska in imunohistokemična razvrstitev skeletnomiščnih vlaken.....	21

3.2.2.1 Encimska histokemija-aktivnost mitohondrijske sukcinske dehidrogenaze.....	21
3.2.2.2 Imunohistokemija-dokazovanje izoform težkih miozinskih verig (MyHC).....	22
3.2.2.3 Histomorfometrična analiza.....	22
3.2.3 Izolacija celotne RNA, sinteza cDNA in kvantitativna verižna reakcija s polimerazo (qPCR).....	23
3.2.4 Statistična analiza	27
4 REZULTATI.....	28
4.1 PODATKI O PRAŠIČIH, VKLJUČENIH V RAZISKAVO.....	28
4.2 ZNAČILNOSTI PROUČEVANIH MIŠIC – PRIMERJAVA LD IN SSC.....	29
4.3 KEMIČNA SESTAVA, DELEŽI IN HISTOMORFOMETRIČNE LASTNOSTI VLAKEN NAJDALJŠE HRBTNE MIŠICE (LD) IN POLTRNOVE MIŠICE GLAVE (SSC) – VPLIV SPOLNE KATEGORIJE.....	33
4.4 RAVEN IZRAŽANJA IZBRANIH GENOV V NAJDALJŠI HRBTNI MIŠICI (LD) IN POLTRNOVI MIŠICI GLAVE (SSC) – VPLIV SPOLNE KATEGORIJE	36
4.5 KORELACIJSKE ANALIZE.....	39
5 RAZPRAVA	41
6 ZAKLJUČKI	45
7 ZAHVALA.....	46
8 VIRI IN LITERATURA	47

KAZALO SLIK

Slika 1: Vonj po merjascu: deskriptorji, odgovorne snovi in dejavniki vpliva.....	7
Slika 2: Prikaz delovanja cepiva za imunokastracijo.....	9
Slika 3: Reprezentativna slika primerjave mod in pomožnih spolnih žlez merjasca (EM) in imunokastriranega prašiča (IC).	9
Slika 4: Zgradba skeletne mišičnine.....	11
Slika 5: Molekula miozina II.....	12
Slika 6: Preobrazba izoform MyHC.....	15
Slika 7: Fotografije klavnih polovic prašičev z označenimi mesti vzorčenja.....	20
Slika 8: Encimska in imunohistokemična razvrstitev skeletnomišičnih vlaken najdaljše hrbtnе mišice (LD) in poltnove mišice glave (SSC).	31

KAZALO GRAFOV

Graf 1: Primerjava izražanja izbranih genov v najdaljši hrbtni mišici (LD) in poltrnovi mišici glave (SSC) med spolnimi kategorijami..	38
Graf 2: Korelacijska analiza med številčnim deležen vlaken in izražanjem genov.	40

KAZALO TABEL

Tabela 1: Izoforne težkih miozinskih verig (MyHC) v prečno progastih mišicah sesalcev z mestom njihovega nahajanja	13
Tabela 2: Lastnosti mišičnih vlaken.....	16
Tabela 3: Aktivnost sukkinske dehidrogenaze (SDH) in specifičnost uporabljenih primarnih protiteles, ki so podlaga za encimsko-/imunohistomemično razvrstitev skeletnomišičnih vlaken v tip I, IIa, IIx in IIb	23
Tabela 4: Informacije o začetnih oligonukleotidih in sondah (A) ter predhodno razvitih testih (B), uporabljenih za qPCR.	26
Tabela 5: Osnovni podatki o prašičih posameznih spolnih kategorij, vključenih v raziskavo.	28
Tabela 6: Kemična sestava, deleži in histomorfometrične lastnosti vlaken najdaljše hrbtnе mišice (LD) in poltnove mišice glave (SSC).	30
Tabela 7: Primerjava izražanja izbranih genov v najdaljši hrbtni mišici (LD) in poltnovi mišici glave (SSC)..	32
Tabela 8: Kemična sestava, deleži in histomorfometrične lastnosti vlaken najdaljše hrbtnе mišice (LD) in poltnove mišice glave (SSC) glede na spolno kategorijo.....	34

RAZLAGA KRATIC

α-GDP	α-glicerofosfatdehisrogenaza (okrajšano iz ang. α- Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)
ATP	adenozintrifosfat (okrajšano iz angl. adenosine triphosphate)
CTB-1B	karnitin pamitoltranferaza IB (okrajšano iz angl. carnitine palmitoyltransferase IB)
CSA	površina prečnega prereza (okrajšano iz angl. cross sectional area)
ELC	esencialna lahka miozinska veriga (okrajšano iz angl. essential light chain)
EM	merjasec (okrajšano iz angl. entire male)
GHRH	somatoliberin (okrajšano iz angl. growth hormone releasing hormone)
GnRH	gonadoliberin (okrajšano iz angl. gonadotropin-releasing hormone)
h	ura (okrajšano iz angl. hour)
IC	imunokastrat (okrajšano iz angl. immunocastrate)
IGF	inzulinu podoben rastni faktor 1 (okrajšano iz angl. insulin-like growth factor 1)
IGF2	inzulinu podoben rasni faktor 2 (okrajšano iz angl. insulin-like growth factor 2)
IMF	intramuskularna maščoba (okrajšano iz angl. intramuscular fat)
LPL	lipoproteinska lipaza (okrajšano iz angl. lipoprotein lipase)
LD	najdaljša hrbtna mišica (okrajšano iz lat. musculus longissimus dorsi)
MyHC	težka miozinska veriga (okrajšano iz angl. myosin heavy chain)
min	minuta
MLC	lahka miozinska veriga (okrajšano iz angl. myosin light chain)
mRNA	sporočilna ribonukleinska kislina (okrajšano iz angl. messenger ribonucleic acid)
NADH-TR	nikotinamidadenin dinukleotid tetrazoliumova reduktaza (okrajšano iz angl. nicotinamide adenine dinucleotide tetrazolium reductase)
nm	nanometer
OD	optična gostota (okrajšano iz angl. optical density)
PBS	fosfatni pufer z NaCl (okrajšano iz angl. phosphate buffer saline)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (okrajšano iz angl. polymerase chain reaction)

PGC-1α	receptor, aktiviran s proliferatorjem peroksisomov-γ, koaktivator 1 alfa (okrajšano iz angl. peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha)
PPARγ	receptor, aktiviran s proliferatorjem peroksisomov γ (okrajšano iz angl. peroxisome proliferator-activated receptor gamma)
qPCR	kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem času (okrajšano iz angl. quantitative real time PCR)
RLC	regulatorna lahka miozinska veriga (okrajšano iz angl. myosin regulatory light chain)
SC	kirurški kastrat (okrajšano iz angl. surgical castrate)
SDH	sukcinska dehidrogenaza (okrajšano iz angl. succinate dehydrogenase)
SSC	poltnova mišica glave (okrajšano iz lat. <i>musculus semispinalis capitis</i>)
µl	mikroliter
LSM	srednja vrednost ocenjena po metodi najmanjših kvadratov (okrajšano iz angl. least square mean)
RMSE	koren povprečne kvadratne napake (okrajšano iz angl. root mean square error)

1 UVOD

Sodobna prašičereja se sooča z iskanjem ustreznih alternativ kirurški kastraciji pujskov, ki je vse manj sprejemljiva z vidika dobrobiti živali. V praksi jo načeloma lahko hitro nadomestijo kirurška kastracija z uporabo analgezije ali anestezije, reja merjascev ali imunokastracija. V primeru reje merjascev so problemi povezani s kakovostjo mesa (vonj po merjascu) in dobrobitjo živali (agresije in poškodbe pri merjascih), v primeru imunokastracije pa s potrošnisko sprejemljivostjo. Imunokastracija je tudi slabo proučena z vidika vpliva na krčljivost in presnovne lastnosti skeletnomišičnih vlaknen ter razmerje med oksidativnimi in glikolitičnimi vlakni. Delež posameznih tipov vlaken v mišici ne določa samo njenih morfoloških in fiziološko-funkcionalnih lastnosti, ampak pomembno vpliva tudi na kakovost mesa, saj pogojuje procese, ki potekajo v mišici po zakolu živali. Mehanizem preobrazbe glikolitičnih mišičnih vlaken v oksidativna še ni dokončno pojasnjen. Udomačitev in načrtna selekcija sta bili pri domačem prašiču povezani s pospešeno hipertrofijo vlaken (predvsem hitro krčljivih glikolitičnih) in povečanjem deleža glikolitičnih mišičnih vlaken, kar z vidika kakovosti mesa ni zaželeno. Na razmerje med tipi vlaken lahko vplivajo tudi način reje, možnost fizične aktivnosti, prehrana in razlike v izražanju kandidatnih genov, povezanih z določenimi lastnostmi kakovosti mesa.

Z raziskavo smo želeli proučiti vpliv hormonskega statusa živali na morfološke in histokemične lastnosti skeletne miščnine. Poudarek je bil na primerjavi histomorfometričnih lastnosti dveh kontraktilno-presnovno različnih mišic, tj. najdaljše hrbtne mišice (LD; *m. longissimus dorsi*) in poltrnove mišice glave (SSC; *m. semispinalis capitis*), med imunokastrati, merjasci in kirurškimi kastrati. Histomorfometrično analizo smo nadgradili še z ugotavljanjem izražanja mRNA izbranih genov, ki določajo i) kontraktilni fenotip mišice (izoforme težkih miozinskih verig, MyHC), ii) presnovni fenotip mišice (lipoproteinska lipaza (LPL) in heksokinaza 2 (HK2)) in iii) jih povezujejo s kakovostjo mesa oz. preobrazbo skeletnomišičnih vlaken (receptor, aktiviran s proliferatorjem peroksisomov γ (PPAR γ), koaktivator 1 alfa PPAR- γ (PGC-1 α) in G-protein α 13 (G α 13)).

Postavili smo ti hipotezi:

1. Vzorec izražanja izoform *MyCH* ter z njim povezane presnovne in morfometrične lastnosti skeletnomišičnih vlaken so odvisni od dolžine androgene deprivacije.
2. Preobrazba skeletnomišičnih vlaken je povezana z razlikami v izražanju PGC-1 α in G α 13.

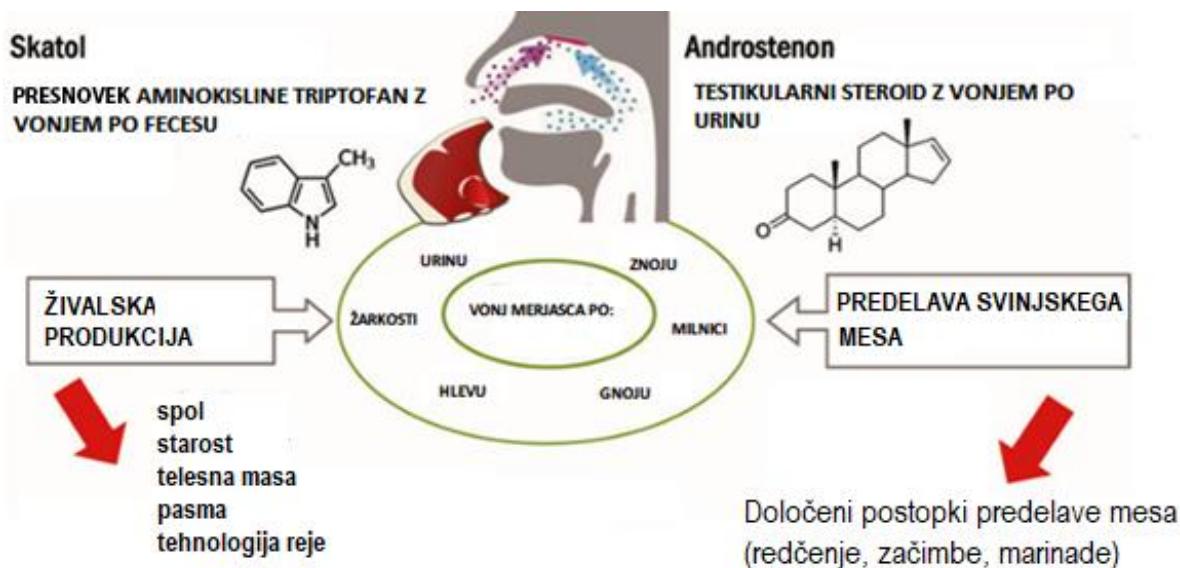
2 PREGLED LITERATURE

2.1 PROBLEMATIKA KIRURŠKE KASTRACIJE

Kastracija ali gonadektomija je običajna praksa v prašičereji, ki se v prvem tednu po skotitvi lahko izvaja brez uporabe anestezije z analgezijo (direktiva sveta EU 2008/120/EC) (1). Gre za kirurško odstranitev mod s pripadajočimi nadmodki in s tem je onemogočeno njihovo endokrino delovanje ter posledično spolni razvoj organizma (2). Kirurška kastracija naj bi povzročala bolečine in akutni stres (2), sledijo ji lahko tudi pooperativni zapleti in kronični stres (3). Dodatno prednost kastracije v rejih predstavlja tudi manj agresivno obnašanje kastratov (4). Vedenjske lastnosti, kot so mirnejši značaj, zmanjšana teritorialnost in borbenost, ki omejijo predvsem število poškodb v skupini živali, so koristne pri opravljanju rejskih opravil.

Za potrošnjo svežega mesa se kastracija pujskov izvaja v večini evropskih držav; izjema so Velika Britanija, Irska, Portugalska, Španija, Grčija in Ciper. Tako se v evropskih državah kastrira več kot 80 % pujskov (5). V večini primerov se ne uporablja pripravkov za lajšanje bolečine ali katero od oblik anestezije. Čeprav splošno uporabljen, pa takšen način sproža vse več dilem in vprašanj v družbi, zato so se glavni akterji v Evropi zavezali k postopni ukinitvi kastracije (6).

Glavni razlog za kastracijo je v preprečevanju neprijetnega vonja mesa spolno zrelih merjascev. Za vonj po mesa merjascu sta glede na literaturo odgovorni dve lipofilni snovi, androstenon in skatol, ki se nalagata v maščobnem tkivu. Njuna koncentracija v maščobnem tkivu je odvisna od vrste rejskih dejavnikov (slika 1); s postopkom predelave lahko vonj v določenih izdelkih maskiramo. Takšno meso in izdelki iz njega so zaradi neprijetnih organoleptičnih lastnosti pogosto zavrnjeni s strani potrošnikov (1).



Slika 1: Vonj po merjascu: deskriptorji, odgovorne snovi in dejavniki vpliva. Povzeto po (7).

Figure 1: Boar taint: descriptors, responsible substances and influential factors. Adapted from (7).

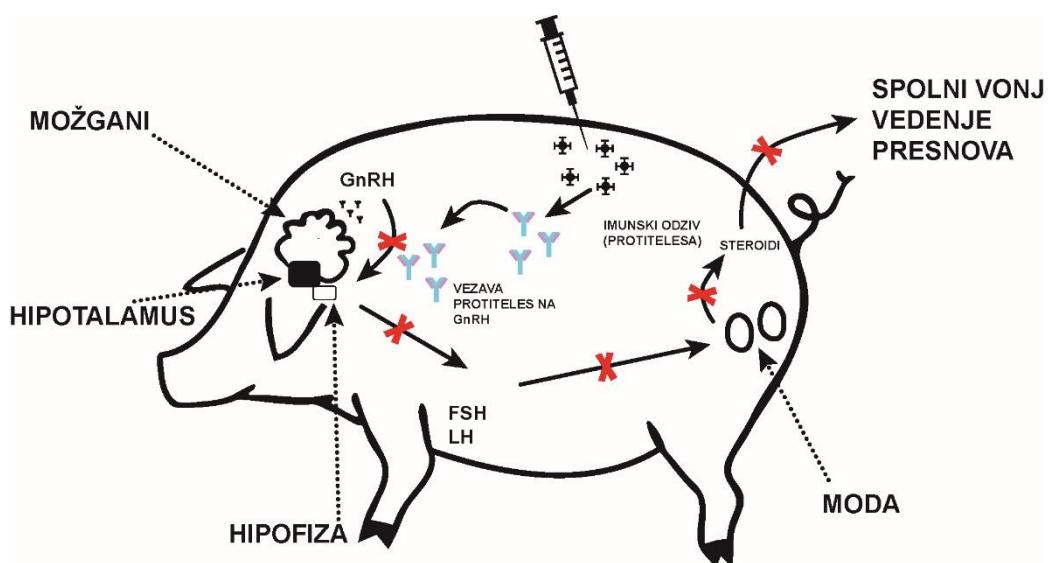
2.2 ALTERNATIVNE METODE KASTRACIJE

Najpogosteje uporabljene alternative kirurške kastracije v Evropi ter po svetu so: a) kirurška kastracija z uporabo anestezije in/ali analgezije, b) reja merjascev in c) imunokastracija (8). Obstaja še možnost sortiranja semenčic, ki še ni dovolj razvita za uporabo v praksi.

- Pri kirurški kastraciji z anestezijo in analgezijo živalim zmanjšamo bolečino med posegom in po njem. Metoda se po izvedbi ne razlikuje od klasične kirurške kastracije. Postopek mora zaradi uporabe farmakoloških sredstev nadzorovati veterinar, zaradi česar je cena storitve višja, kar za rejce ni zaželeno.
- S finančnega vidika je med alternativnimi metodami najugodnejša reja merjascev, v kolikor bi se spremenil plačilni sistem. Merjasci imajo bistveno boljše proizvodne rezultate, boljšo konverzijo krme in mesnatost klavnih trupov (9). Vendar pa morajo v zakol pri nižji telesni masi, to je pred nastopom spolne zrelosti, da se izognemo vonju mesa po merjascu. Za nekatere mesne proizvode višje kakovosti so merjasci neprimerni, saj zahtevajo meso starejših in težjih živali, proizvodi vsebujejo večji delež maščob ali

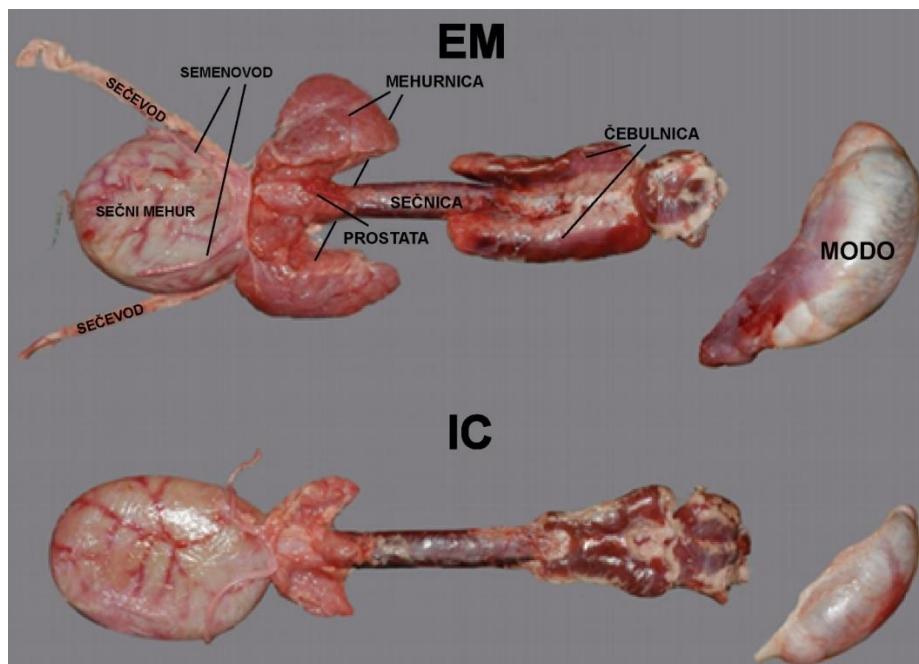
pa se uživajo topli, kar vse povečuje tveganje zaznave vonja po merjascu (10). Na klavni liniji je priporočen tudi nadzor vonja mesa, za kar je potreben dodatno usposobljen kader.

- c) Pri imunokastraciji gre za deprivacijo androgenih hormonov samcev z vakcinacijo. V Evropski uniji je od leta 2009 registrirana in torej dovoljena za uporabo vakcina IMPROVAC® (Zoetis, Belgija), ki vsebuje sintetični analog gonadoliberina (GnRH) vezanega na imunogeni nosilni protein (toksoid davice) iz bakterije *Corynebacterium diphtheriae*. Z vakcinacijo povzročimo v telesu proizvodnjo protiteles proti GnRH, ki zavirajo hipotalamusno hipofizno-gonadalno os (HPG (11)), izločanje gonadotropnih hormonov, luteinizirajočega hormona (LH) in folikel stimulirajočega hormona (FSH) ter posledično regresijo spolnih žlez (sliki 2 in 3) in zmanjšano steroidogenezo (3). Za učinkovito imunokastracijo sta potrebni dve vakcinaciji prašičev s cepivom IMPROVAC®. Protokol aplikacije zajema podkožni vnos dveh odmerkov po 2 ml cepiva apliciranega v razmaku štirih tednov. Karenca pri cepivu ni navedena, niti potrebna. Po priporočilu proizvajalca se prvo cepljenje pri prašičih priporoča v starostih 8 do 9 tednov, aplikacija drugega odmerka cepiva pa 4 do 6 tednov pred zakolom živali. Z drugim odmerkom zagotovimo v krvi zadosten titer protiteles, ki zavre delovanje mod in s tem omogočimo presnovo androstenona in skatola, snovi odgovornih za vonj po merjascu. Prav tako imunokastracija zmanjša spolno-pogojeno agresivno obnašanje (12).



Slika 2: Prikaz delovanja cepiva za imunokastracijo. Povzeto po (8).

Figure 2: Demonstration of the immunocastration vaccine impact. Adapted from (8).



Slika 3: Reprezentativna slika primerjave mod in pomožnih spolnih žlez merjasca (EM) in imunokastriranega prašiča (IC). Povzeto po (13).

Figure 3: Representative image of testes and accessory reproductive glands belonging to a boar (EM) and an immunocastrated male (IC). Adapted from (13).

2.3 HISTOLOŠKA ZGRADBA SKELETNE MIŠČNINE

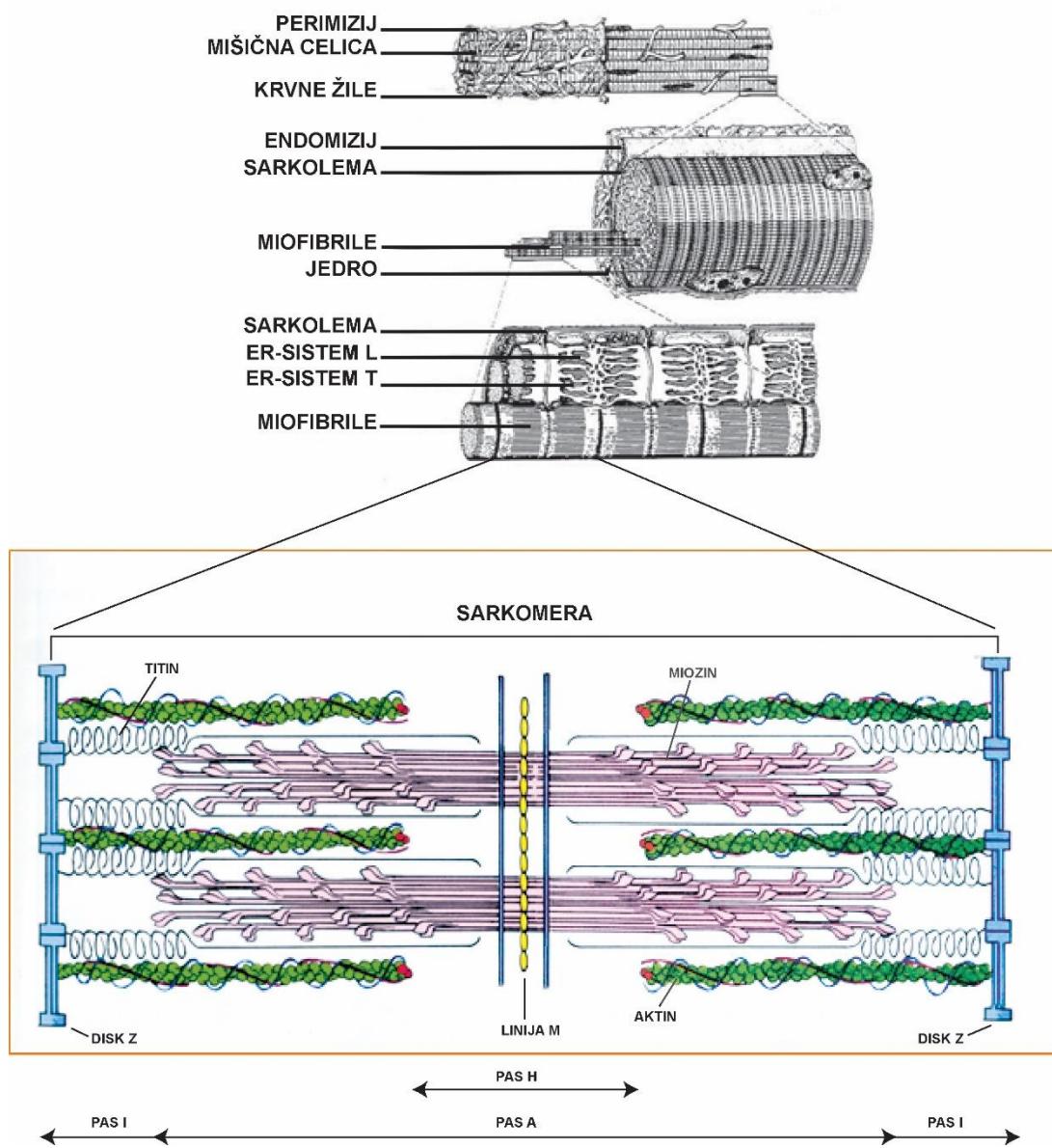
Skeletne mišice, ki se po zgradbi uvrščajo med prečnoprogasto mišičnino, predstavljajo med tretjino in polovico žive mase živali (14). Skeletna mišična vlakna sesalcev delimo na podlagi kontraktilnih značilnosti in načina presnove. Med živalskimi vrstami so velike razlike, prav tako so te opazne med različnimi mišičnimi skupinami pri isti vrsti živali. Te so posledica različnega mišičnega dela in uporabnosti mišice, načina reje, prehrane in hormonskega statusa živali. V nadaljevanju so predstavljene osnovne morfološke in histokemične značilnosti mišičnih vlaken.

2.3.1 Zgradba in krčljivi elementi mišičnega vlakna

Osnovna morfološka in funkcionalna enota skeletnih mišic je mišično vlakno, ki je dolga (do več 10 cm), valjasta, večjedrna celica, ki v premeru meri od 10 do 110 µm. Jedra so ovalna in ležijo na periferiji vlakna pod plazmalemo (sarkolemo). Sarkolema predstavlja plazmalemo, ki ji prilega bazalna membrana sestavljena iz basalne lamine in plasti retikulinskih vlaken. Na zunanji strani sarkoleme, vendar še znotraj njene basalne lamine ležijo satelitske celice. Gre za populacijo neaktivnih mioblastov, ki imajo vlogo pri regeneraciji vlakna (14). Vezivo, t. i. endomizij, obdaja posamezna mišična vlakna, ki se povezujejo v snope različnih debelin, ki jih obdaja druga plast veziva, t. i. perimizij. Snopi mišičnih vlaken se povezujejo v funkcionalno zaključene mišice, ki jih obdaja vezivna ovojnica, imenovana epimizij (14).

Približno 80% prostornine mišičnega vlakna zapolnjujejo miofibrile, ki merijo v premeru 1 µm. Število miofibril v mišičnem vlaknu je odvisno od premera vlakna (15), velikost vlaken pa se povečuje s starostjo živali oz. diferenciacijo vlaken (16). Razvojna fetalna vlakna sestojijo iz približno 50 miofibril, v zrelih mišičnih vlaknih pa jih je tudi do 2000. Miofibrile potekajo vzporedno z vzdolžno osjo mišičnega vlakna, kar da vlaknom pod mikroskopom značilen prečnoprogast videz, ki je posledica ponavljanjačih se pasov tanjših aktinskih (izotropni pas I) in debelejših miozinskih (anizotropni pas A) nitk. Ponavljanječe se izmenjujoče pasove aktinskih in miozinskih nitk, ki se v miofibrili ponavljajo na 2–3 µm imenujemo sarkomera. Nitke iz pasov so med seboj značilno povezane. Aktinske nitke so v središču pasu I vpete v disk Z, s svojimi prostimi konci pa segajo v pas A, kjer so na sredini pasu le debele miozinske nitke, t. i. pas H. Miozinske nitke so medsebojno povezane vzdolž sredine pasu H, kar vidimo kot

elektronsko gosto linijo M. Na vsaki strani linije M je še elektronsko svetlejše psevdo H področje. Okoli miofibril je značilno razporejen sistem sarkoplazemskega retikuluma, mitohondriji in prečne cevke (tubuli T), ki so značilne invaginacije sarkoleme. Sarkomero sestavljajo tudi drugi proteini. V pasu H sta tako protein M in miomezin, ki vzdržujejo enakomerno razdaljo med miozinskimi nitkami. Titin pripnja miozinske nitke na linijo Z, katere glavni protein je α -aktin (slika 4) (17).

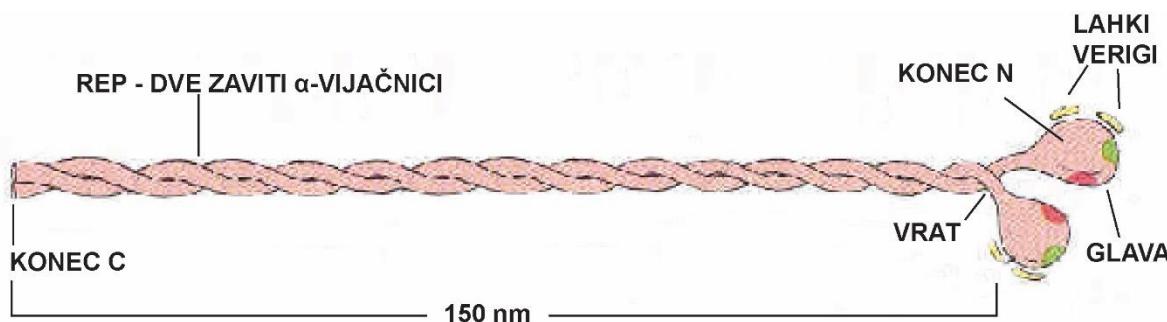


Slika 4: Zgradba skeletne mišičnine. Povzeto po (15).

Figure 4: Skeletal muscle structure. Adapted from (15).

2.3.1.1 Sestava aktinskih in miozinskih nitk

Miofibrilarni proteini se pojavljajo v različnih oblikah, imenovanih izoforme. Aktinske in miozinske nitke se razlikujejo po sestavi. V nasprotju z miozinskimi nitkami, ki sestojijo le iz ene vrste proteina, tj. miozina, aktinske nitke sestavljajo različni proteini, na primer aktin, troponin in tropomiozin s pridruženim tropomodulinom (17).



Slika 5: Molekula miozina II. Povzeto po (16).

Figure 5: Myosin II molecule. Adapted from (16).

Poznamo različne razrede iz družine miozinov, v skeletnih mišicah je miozin iz razreda II. Miozinska nitka sestoji iz nekaj sto miozinskih molekul, ki imajo obliko dvojno zavite nitke z dvema glavama. Ti nitki tvorita težki miozinski verigi z molekulsko maso več kot 200.000 daltonov. Kot je prikazano na sliki 5 zgoraj, lahko težko miozinsko verigo razdelimo tudi na podlagi encimske aktivnosti, in sicer na rep (lahki meromiozin), vrat, ki je gibljivi del, in glavo. Na glavi je mesto za vezavo z aktinom, ki vsebuje miozinsko ATP-azo z encimsko aktivnostjo. Na tem delu so težkima verigama pridružene štiri lahke verige (MLC – okrajšano iz angl. myosin light chain), par esencialnih verig (ELC) in par regulatornih verig (RLC) s kar desetkrat manjšo molekulsko maso. Na glavi je tudi konec N (aminokonec), na skrajnem delu repa pa konec C (karboksilni konec). Miozinska nitka deluje kot motor, ki prek ATP-azne aktivnosti pretvarja ATP (aktivnost ATP-aze katalizira razpad adenozintrifosfata (ATP) na adenozindifosfat (ADP), ki je kemična energija (18), v mehnsko silo, in tako omogoči skrajševanje sarkomere in s tem celotnega mišičnega vlakna (19). Aktivacija miozina v mišicah poteka zaradi naglo dvignjene koncentracije kalcija, ki se sprosti iz sarkoplazemskega retikuluma. Kalcij se veže na podenoto C troponina, ki premika tropomiozin. Tropomiozin, ki

je ovit okoli aktina, preprečuje spontano vezavo miozina nanj. Tako lahko pride do vezave le ob visokih koncentracijah kalcija v citosolu mišičnih vlaken. Pri sproščanju mišice pa so pomembni tudi ADP, anorganski fosfat in ATP (20).

Poznamo več različnih izoform MyHC v prečnoprogasti srčni in skeletni mišičnini pri sesalcih – I, α -kardialna, embrionalna, IIa, IIx, IIc, IIb, fetalna in ekstraokularna –, ki so kodirane z različnimi geni ter so pri prašiču na 7. in 14. kromosomu. Obstajajo vrstne, kot tudi individualne razlike v izražanju in razporeditvi izoform MyHC (tabela 1). Tri od naštetih vrst mišičnih izoform MyHC (I, IIa, IIx) se pojavljajo v skeletni mišičnini pri večini vrst sesalcev v nasprotju z MyHC IIb, ki ni izražena pri ovcah in konjih, pri govedu pa se pojavlja le v nekaterih mišicah. Pri prašiču je prisotno močno izražanje MyHC IIb v skeletnih mišicah, predvsem pri tistih pasmah, ki so zaradi dobre rasti izbrane za intenzivno prašičerejo (18).

Tabela 1: Izoforme težkih miozinskih verig (MyHC) v prečno progastih mišicah sesalcev z mestom njihovega nahajanja. Povzeto po (16).

Table 1: Isoforms of heavy myosin chains (MyHC) in mammalian striated muscles and their location. Adapted from (16).

Oznaka izoforme	Opis	Tipi vlaken in njhova pojavnost v mišicah
MyHC-β (MyHC-I)	Tip I, počasna, β -kardialna	Počasna vlakna ali tip I v skeletnih mišicah, mišičnina srčnih prekatov.
MyHC-Ia	počasna a	Nekatera počasna vlakna pri kuncu.
MyHC-α	A-kardialna	Srčna mišičnina, žvekalne mišice, mišice zrkla, mišična vretena, prehodno v nekaterih skeletnih mišicah med razvojem.
MyHC-IIa	IIa, hitra	Hitra vlakna skeletnih mišic.
MyHC-IIx	IIx (IID), hitra	Hitra vlakna skeletnih mišic.
MyHC-IIb	IIb, hitra	Hitra vlakna skeletnih mišic.
MyHC-emb	embrionalna	Skeletne mišice v zgodnji razvojni faziji, žvekalne mišice, mišice zrkla, mišična vretena.
MyHC-neo	neonatalna	Skeletne mišice v pozni razvojni faziji, žvekalne mišice, mišice zrkla, mišična vretena.
MyHC-eo	ekstraokularna	Mišice zrkla in grlne mišice.
MyHC-l	laringealna	Grlne mišice pri človeku.
MyHC-m	mastikatorna	Žvekalne mišice pri nekaterih sesalcih (mesojedi in primati).
MyHC-ton	počasna tonična	Mišice zrkla in mišična vretena.

2.3.2 Razvoj mišičnih vlaken

Skletena mišičnina izvira iz mezoderma, natančneje iz dorzolateralnega dela somitov (kožnomišična plošča; dermomiotom), iz katerih nastanejo dermatomi in miotomi. Iz miotomov pozneje v razvoju nastane mišičnina telesnega debla, telesne stene in okončin. Miogeneza vključuje determinacijo mezodermalnih matičnih celic v miogeno linijo, migracijo, proliferacijo, diferenciacijo in združevanje mioblastov ter izoblikovanje miofibril. Manjši delež mioblastov se ohrani kot samostojne celice tudi v odraslem obdobju kot t.i. satelitske celice, preostali mioblasti pa se združijo v primarne miotube (21). Nadaljnja rast vlaken v širino je posledica množitve miofibril, na vsakem koncu pa poteka dodajanje sarkomer, kar podaljšuje njihovo dolžino. O miotubah govorimo, dokler so jedra v celicah na sredini, ko pa se ta začno premikati na obrobje, pa jih že lahko imenujemo mišična vlakna.

Miogeneza pri prašiču poteka v dveh fazah (slika 6). Predhodniki počasi krčljivih vlaken so primarni miotubi, ti že kmalu v fetalnem razvoju začnejo izražati počasno embrionalno izoformo MyHC, ki se delno razlikuje od odrasle počasne izoforme. Tu si vzorec preobrazbe sledi:

embrionalna počasna izoforma → neonatalna počasna izoforma → zrela počasna izoforma

Preobrazba v hitra mišična vlakna poteka v več stopnjah, le redko je opisana neposredna preobrazba iz primarnih vlaken v hitro krčljiva vlakna. Fetalna in postnatalna preobrazba izoform MyHC je podrobnejše predstavljena na sliki 6. V prenatalnem obdobju primarni miotubi izražajo predvsem MyHC I, hitro krčljivi sekundarni miotubi pa embrionalne in perinatalne izoforme MyHC. Ob koncu gestacije se večina razvojnih oblik MyHCs zamenja z odraslimi. Zamenjava poteka v tem zaporedju:

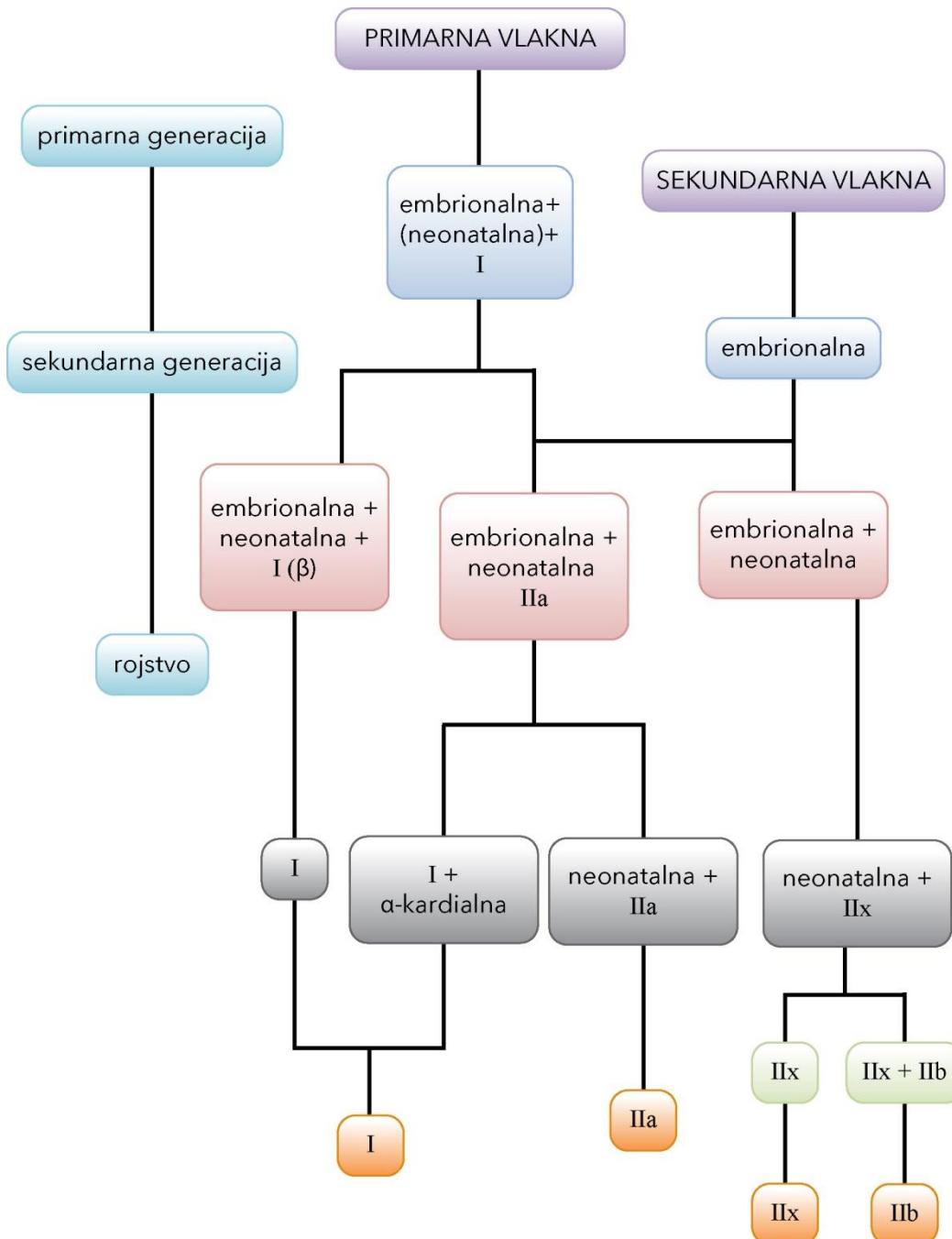
embrionalna/perinatalna izoforma → IIa izoforma → IIx izoforma → IIb izoforma

Ob rojstvu sta že izraženi izoformi MyHC IIa in MyHC IIx, medtem ko se MyHC IIb pojavi šele v postnatalnem obdobju (22).

Po nekaterih podatkih iz literature (23) naj bi se v poznejšem razvoju oblikovala tudi tretja generacija mišičnih vlaken, ki je podobna drugi generaciji.

Zakaj pride v času embrionalnega in postnatalnega razvoja do značilne preobrazbe izoform MyHC, pojasnjujejo tri hipotetične razlage. Vplivali naj bi regulatorni mehanizmi, ki aktivirajo gene MyHC, razvojne izoforme naj bi predale kontraktilno zmožnost zrelim oblikam MyHC in

zaporedni razvoj izoform naj bi bil potreben za ustrezeno oblikovanje strukture sarkomere, kar opazimo tudi pozneje ob regeneraciji miščnine, ko se pojavijo embrionalne in neonatalne izoforme MyHC (24). Ob rojstvu so vsa vlakna oskidativnega tipa, ta se v prvih tednih postnatalnega razvoja začnejo preoblikovati tudi v druge presnovne oblike, kot so glikolitična ter oksidativno-glikolitična vlakna (22).



Slika 6: Preobrazba izoform MyHC. Povzeto po (16).

Figure 6: Myosin heavy chain isoform transformation. Adapted from (16).

2.3.3 Kontraktilno-presnovne lastnosti in klasifikacija mišičnih vlaken

V preteklosti so različne tipe mišičnih vlaken določali na podlagi miofibrilarne ATP-aze. Ta je vlakna razdelila na počasna mišična vlakna tipa I ter tipa hitro krčljivih vlaken IIa in IIb. Poznamo tudi vmesne tipe krčljivih vlaken, in sicer med tipoma I in IIa so vlakna tipa IIc ter vmesna stopnja med vlakni IIa in IIb, ki je IIx. V današnjem času se je bolj uveljavilo prepričanje, da se mišična vlakna razlikujejo po svojih krčljivih lastnostih, ki so odvisna predvsem od izražanja izoform MyHC. Skladno z vzorcem izraženosti odraslih izoform MyHC (I, IIa, IIx in IIb), se pri odraslem prašiču pojavljajo štirje tipi mišičnih vlaken (I, IIa, IIx in IIb). Mišična vlakna lahko delimo tudi glede na presnovno pot regeneracije ATP. Poznamo dve poti, oksidativno ali aerobno pot ter glikolitično ali anaerobno pot. Tako se delijo tudi mišična vlakna na oksidativna, oksidativno-glikolitična in glikolitična. Oksidativna vlakna označujemo tudi kot rdeča, saj so bogata z mioglobinom, in bela ali glikolitična vlakna, v katerih so potrebe po kisiku manjše. Tipa I in IIa mišičnih vlaken spadata torej v skupino oksidativnih vlaken, tip IIb med glikolitična, tip IIx je mešanega presnovno oksidativno-glikolitičnega tipa (22). Hitrost krčenja se povečuje od vlaken tipa I proti vlaknom tipa IIb, v nasprotni smeri pa upada njihova vzdržljivost. V splošnem velja tudi, da imajo oksidativna vlakna manjšo površino prečnega prereza (iz angl. cross sectional area (CSA)) kot glikolitična vlakna. Premer vlaken pa se lahko razlikuje tudi glede na vrsto mišice (18). Osnovne lastnosti mišičnih vlaken povzema tabela 2.

Tabela 2: Lastnosti mišičnih vlaken. Povzeto po (18).

Table 2: Characteristics of muscle fibers. Adopted from (18).

	Tip vlaken			
Lastnost	I	IIa	IIx	IIb
hitrost kontrakcije	+	+++	++++	+++++
miofibrilarna ATPasa	+	+++	++++	+++++
vzdržljivost	+++++	++++	++	+
oksidativna presnova	+++++	++++	++	+
glikolitična presnova	+	++++	++++	+++++
glikogen	+	++++	++++	+++++
trigliceridi	+++++	+++	+	+
ožiljenost	+++++	+++	+++	+
mioglobin	+++++	++++	++	+
premer	++	++	+++	+++++

+ zelo nizko, ++ nizko, +++ srednje, ++++ visoko, +++++ zelo visoko

2.3.4 Vpliv različnih dejavnikov na kontraktilno-presnovni in morfometrični profil mišičnih vlaken

Kontraktilno-presnovni in morfometrični profil mišičnih vlaken je pod vplivom genetskih (pasma, spol) in drugih dejavnikov kot so starost, fizična aktivnost, temperatura okolja, način reje in prehrana (21). V nadaljevanju je predstavljen le vpliv spola ozziroma androgenov ter izbranih genov povezanih s histokemičnimi značilnostmi mišičnih vlaken in preobrazbo glikolitičnih vlaken v oksidativna.

2.3.4.1 Vpliv spola

Na prenatalni razvoj mišičnih vlaken vplivajo rastni dejavniki, inzulinu podoben rastni dejavnik 1 in 2 (IGF1 in IGF2) in hormoni ščitnice. Mišice se dokončno izoblikujejo ob nastopu spolne zrelosti živali, ko se poveča vpliv spolnih hormonov (estrogenov in androgenov). Skeletna mišičnina je ciljno tkivo za spolne hormone, saj izraža receptorje za estrogene (ER) in androgene (AR). Testosteron lahko deluje direktno z vezavo na AR, ki jih v večji meri izražajo satelitske celice. Učinki testosterona so lahko posredovani tudi preko (ER), ker aromataza pretvori testosteron v estrogene. Vplivi testosterona na mišice so vidni v povečanju CSA vlaken tipa I in II (hipertrofija), zato se premer mišičnih vlaken pogosto uporablja kot indeks občutljivosti na androgene. Poveča se tudi število jeder v mišičnih vlaknih in število satelitskih celic (25). Odzivnost na androgene se razlikuje tudi med tipi mišičnih vlaken, kar povezujejo z razlikami v zastopanosti satelitskih celic, ki je večja v vlaknih z visokim oksidativnim potencialom (26).

2.3.4.2 Vpliv androgene deprivacije pri prašičih

Iz literature (27) je dobro znano, da so kirurški kastrati v primerjavi z merjasci bolj zamaščeni in imajo tudi več intramuskularne maščobe (IMF). Imajo tudi manjši premer mišičnih vlaken in manj vezivnega tkiva od merjascev, medtem ko literatura pomembnih razlik med kastrati in merjasci v deležu mišičnih vlaken različnega kontraktilno-presnovnega tipa ne navaja (28). Omenjena literatura primerja nekastrirane prašiče s kirurško kastriranimi kmalu po rojstvu (zgodnja kastracija), medtem ko je malo znanega o vplivu imunokastracije, ki povzroči androgeno deprivacijo pozno v spolnem razvoju. V primeru imunokastracije druga vakcinacija

povzroči hiter in intenziven fiziološki odziv, ki se odraža v povečanem apetitu in zauživanju krme (29) ter razlikah v hormonskem statusu (leptin, IGF1) pri imunskih kastratih (30). Raziskave kažejo, da se v času od druge vakcinacije do zakola (večinoma 4-6 tednov) imunokastratom značilno poveča vsebnost IMF in spremeni maščobnokislinska sestava različnih maščobnih depojev (28). To kaže na pomembne učinke na energetsko presnovo v mišičnem in maščobnem tkivu v relativno kratkem času, kar pa na celični ravni oziroma z vidika izražanja genov vključenih v te procese še ni pojasnjeno.

2.3.4.3 Geni povezani s presnovnim fenotipom in preobrazbo mišičnih vlaken

Geni, ki sodelujejo pri presnovi lipidov imajo pomembno vlogo pri kakovosti mesa, predvsem v povezavi z deležem IMF. Po podatkih (22) naj bi živali z višjim odstotkom SDH pozitivnih miofibril imele tudi višji procent IMF ter pozitivno povezavo z MyHC-I. Glede na odstotek maščobe pa naj bi bila negativna korelacija med MyHC-IIb ter količino IMF.

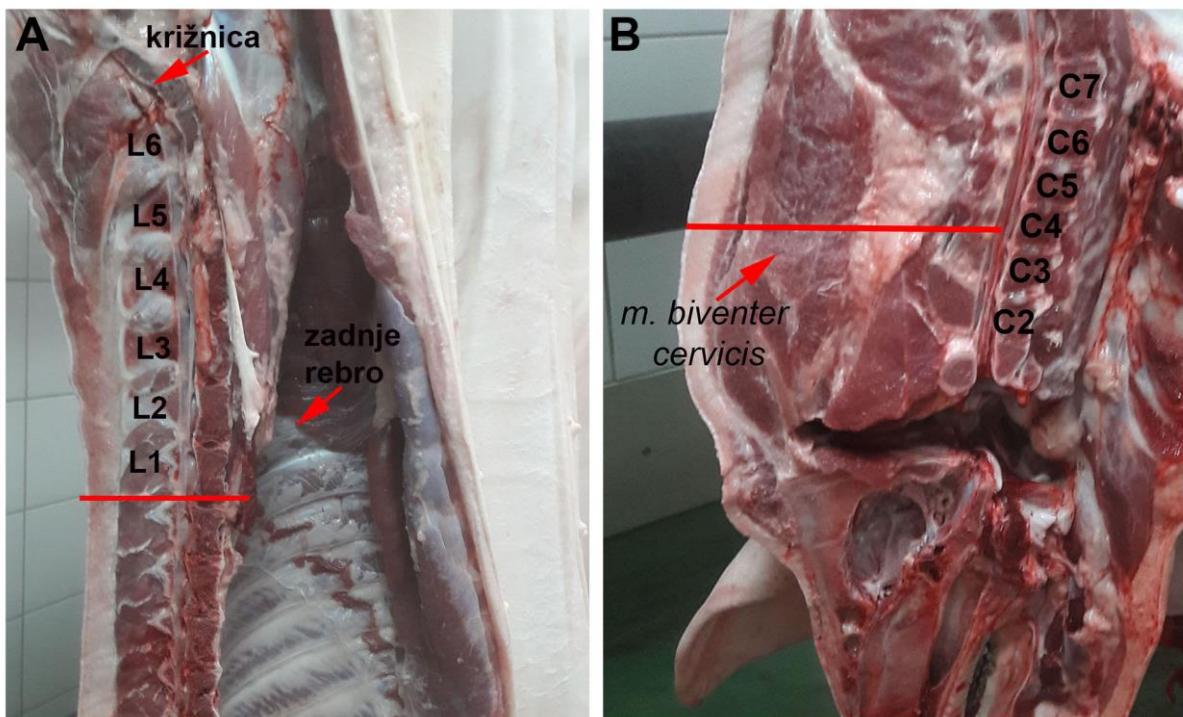
S kakovostjo mesa ter lipidno presnovo oziroma preobrazbo vlaken povezujejo naslednje gene: receptor, aktiviranim s proliferatorjem peroksisomov γ (PPAR γ), PPAR γ koaktivator 1 alfa (PGC-1 α) in lipoproteinsko lipazo (LPL). PGC-1 α učinkuje na številne ciljne gene, ki so pomembni za oksidativno presnovo, število mitohondrijev, diferenciacijo mioblastov in preobrazbo hitro krčljivih glikolitičnih v počasi krčljiva oksidativna vlakna. (31-33). PPAR γ je glavni regulator adipogeneze in lipogeneze. Nedavna študija je razkrila, da njegovo prekomerno izražanje v skeletni mišičnini spodbuja preobrazbo glikolitičnih mišičnih vlaken v oksidativna in povečuje vsebnost IMF pri prašičih (34). LPL spodbuja vnos maščobnih kislin v mišično tkivo in raven izražanja LPL prav tako povezujejo z vsebnostjo IMF. Nasprotno pa je heksokinaza 2 (HK2) ključni encim glikolize v skeletnih mišicah (35), na izražanje HK2 vplivajo tudi androgeni, vendar je njihov vpliv tkivno specifičen (34). Pri proučevanju skeletne mišičnine je v zadnjem obdobju vse večji poudarek tudi na znotrajceličnih signalnih poteh, ki jih aktivirajo membranski receptorji iz družine receptorjev, sklopljenih s proteinom G, z vidika vpliva na preobrazbo mišičnih vlaken in presnovo. Med šestnajstimi različnimi α -podenotami proteina G je v skeletni mišičnimi raven izražanja G α 13 razmeroma visoka. Specifično utišanje G α 13 v skeletni mišičnimi povzroči, da skeletne mišice pridobijo oksidativni fenotip in povečajo presnovo maščobnih kislin (36).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Podatki o živalih in vzorcih mišic

V raziskavi smo uporabili vzorce mišic, ki so bili odvzeti eni klavni seriji 36 prašičev (od skupno 144), ki so bili vključeni v poskus v okviru projekta SuSi (EU program H2020 ERA-NET SusAn). Poskus je odobril etični odbor za poskuse na živalih iz Tübingena (Baden-Wuerttemberg, Nemčija); številka dovoljenja ID HOH 47/17TH. Izveden je bil na eksperimentalni enoti Univerze v Hohenheimu (Unterer Lindenhof 2572800 Eningen, Nemčija) v skladu z Direktivo 2010/63/EU (37). Poskus so opravili nemški partnerji pri projektu (Inštitut za živalske vede univerze v Hohenheimu, Nemčija) kot je bilo predhodno opisano (38). Na kratko, prašiči (komercialni križanci med pasmami nemška landrace, large white in pietrain) so bili razdeljeni v tri spolne kategorije; merjasci (EM, n = 12), kirurški kastrati (SC, n = 12) in imunokastrati (IC, n = 12). Živali so bile vzrejene v naslednjih pogojih: 1,2 m² na prašiča, polna tla, 6 živali na boks, imale so neomejen dostop do vode in enake komercialne mešanice krmila. Krmljenje je potekalo dvakrat na dan med 7:45 in 8:00 zjutraj in med 16:00 in 16:30 uro popoldne. Sestava krmne mešanice je bila prilagojena obdobju pitanja (trifazno krmljenje; prva faza 10-17 teden, druga faza 17-21 teden in tretja faza 21-27/28 teden) in je temeljila na priporočilih za merjasce, kot je bilo predhodno opisano (39). Prašiči iz skupine IC so bili po navodilih proizvajalca dvakrat cepljeni proti GnRH s cepivom Improvac® (Pfizer Animal Health, Berlin, Nemčija), ko so bili stari 12 tednov in 21,5 tedna. Merjaščki skupine SC so bili kirurško kastrirani, brez anestezije, kot dovoljuje zakonodaja (do starosti 7 dni), s protibolečinsko terapijo po posegu z 0,2 mL Metacama® (Meloxicam, 5 mg/mL). Ko so bile živali stare 27,5 tedna in je njihova masa dosegla 123,7 ± 1,8 kg, so bile zaklane v eksperimentalni klavnici (LSZ Boxberg, Boxberg, Nemčija) po standardnem postopku z omamljanjem v komori CO₂ in izkravavitvijo. Trupi so bili razdeljeni na klavne polovice in stehtani. Meritve klavnih trupov in vzorčenje mišic so opravili slovenski partnerji pri projektu s Kmetijskega inštituta Slovenije in Veterinarske fakultete v Ljubljani. Meritve klavnih trupov so bile predhodno opisane (28). Vzorce mišičnega tkiva (2 x 1 cm³/mišico) smo odvzeli iz osrednjega dela LD) v višini zadnjega rebra in iz SSC, in sicer iz osrednjega dela njene dvotrebušne vratne mišice (*m. biventer cervicis*) v višini četrtega vratnega vretenca (slika 7).

Po odvzemu in zamrznitvi v tekočem dušiku pri -196°C smo vzorce na suhem ledu (temperatura -78.5°C) prepeljali v Slovenijo (Inštitut za predklinične vede, Veterinarska fakulteta), kje so bili do nadalnjih analiz shranjeni na -80°C .



Slika 7: Fotografije klavnih polovic prašičev z označenimi mesti vzorčenja (A) najdaljše hrbtne mišice v višini zadnjega rebra in (B) dvotrebušne vratne mišice (*m. biventer cervicis*), ki je del poltrnove mišice glave (SSC, *m. semispinalis capititis*) v višini četrtega vratnega vretenca. S črko L so označena ledvena vretenca in s črko C vratna.

Figure 7: Photographs of pig carcass cut in half with marked sampling sites of (A) *m. longissimus dorsi* (LD) at the level of the last rib and (B) *m. biventer cervicis*, which is part of the *semispinalis capititis muscle* (SSC) at the level of the 4th cervical vertebra. The letter L marks the lumbar and C the cervical vertebrae.

3.2 METODE

3.2.1 Določanje kemične sestave mišic

Vsebnost IMF, vode in beljakovin v obeh proučevanih mišicah (LD in SSC) je bila določena z metodo infrardeče spektroskopije in uporabo internih kalibracijskih enačb (NIR Systems 6500, Foss NIR System, Silver Spring, MD, ZDA) na Kmetijskem inštitutu Slovenije. Pripravo vzorcev in analize so naredili sodelavci raziskovalne skupine za kakovost mesa na Kmetijskem inštitutu v Ljubljani.

3.2.2 Encimska in imunohistokemična razvrstitev skeletnomišičnih vlaken

Za razvrstitev skeletnomišičnih vlaken v tip I, IIa, IIx in IIb smo uporabili kombinacijo encimske- in imunohistokemije, kot je bilo predhodno opisano (40). S kriostatskim mikrotomom Leica CM 1800 (Heidelberg, Nemčija) smo pri temperaturi -17°C ($\pm 2^{\circ}\text{C}$) iz zamrznjenih koščkov mišičnega tkiva obeh proučevanih mišic narezali šest zaporednih, kriostatskih $10\ \mu\text{m}$ rezin. Rez je potekal pravokotno na vzdolžno os mišičnih vlaken. Rezine smo prenesli na adhezivne predmetnice (Thermo Scientific™ Superfrost® Plus; Braunschweig, Nemčija) in jih hranili pri -80°C do nadaljnje obdelave.

3.2.2.1 Encimska histokemija – aktivnost mitohondrijske sukcinske dehidrogenaze (SDH)

Za oceno oksidativnega potenciala skeletnomišičnih vlaknen smo uporabili reakcijo na mitohondrijski encim Krebsovega cikla SDH po Nachlasu in sod. (1957) (41). Medij za inkubacijo kriostatskih rezin smo pripravili iz 0,2-molskega fosfatnega pufra (pH 7,6), 0,2 M raztopine dinatrijevega sukcinata in vodne raztopine nitro modre tetrazolijeve soli (NBT; 1 mg/ml) v volumskem razmerju 1 : 1 : 2. Inkubacija je potekala 40 min pri 37°C v vlažni komori. Po končani inkubaciji smo rezine izprali pod tekočo vodo ter jih nato dehidrirali v naraščajoči vrsti alkoholov (70-odstotni, 96-odstotni in dve menjavi v absolutnem etanolu) in ksilolu (3 menjave), vklopili v sintetično smolo (Synthetic Moutant, Shandon, ZDA) in pokrili s krovnim stekelcem. V primeru aktivnosti SDH se NBT reducira v modroobarvani precipitat formazana, kar vidimo kot različno intenzivno, modro obarvan reakcijski produkt v vlaknih. Aktivnost

SDH je zelo močno izražena v oksidativnih vlaknih tipa I in IIa, zmerna v presnovno vmesnem tipu vlaken IIx in nezaznavna v vlaknih tipa IIb (tabela 3).

3.2.2.2 Imunohistokemija – dokazovanje izoform težkih miozinskih verig (MyHC)

Razvrstitev skeletnomišičnih vlaken na podlagi aktivnosti SDH smo dopolnili z imunohistokemičnim dokazovanjem prisotnosti odraslih izoform MyHC, značilnih za določen tip skeletnomišičnih vlaken. Uporabili smo monoklonski protitelesi (MAb):

- NLC-MHC (slow oz. počasni), ki je specifično za izoformo MyHC I (Novocastra laboratories, Newcastle in Tyne, Velika Britanija);
- MAb SC 71 (Developmental Studies Hybridoma Bank; Univeza v Iowi, ZDA), ki ga je razvil S. Schiaffino in je specifično za MyHC IIa (42) in pri prašiču tudi za MyHC IIx (43).

Predmetnice s sveže posušenimi kriostatskimi rezinami smo inkubirali v ustrezno razredčenem primarnem MAb v 0,01-molskem fosfatnem pufru s soljo (PBS; pH 7,2–7,4) čez noč pri 4 °C v vlažni komori. NLC-MHC smo uporabili v razredčitvi 1 : 5 in SC 71 v razredčitvi 1 : 40. Po končani inkubaciji smo predmetnice izpirali s PBS (trikrat po 10 min). Za vizualizacijo kompleksa med antigenom in Mab smo uporabili komercialno dostopni kit Dako REAL™ EnVision™ (København, Danska) in sledili navodilom proizvajalca. Po končanem izpiranju v PBS smo rezine 30 min inkubirali v vlažni komori pri sobni temperaturi v raztopini sekundarnih protiteles, konjugiranih s hrenovo peroksidazo (kozji protimišji/protikunčji IgG). Po izpiranju s PBS smo reakcijo razvili v substratu iz 0,01-odstotnega 3-3'-diaminobenzidin tetrahidroklorida (DAB) in 0,002-odstotnega H₂O₂ v 0,4-molskem pufru Tris (pH 7,6). Po 2 min smo reakcijo ustavili z izpiranjem v tekoči vodi. Rezine smo nato dehidrirali v naraščajoči vrsti alkoholov in ksilolu, vklopili v sintetično smolo (Syntetic Moutant, Shandon, ZDA) in pokrili s krovnimi stekelci.

3.2.2.3 Histomorfometrična analiza

Histomorfometrično analizo serijskih rezin smo opravili z mikroskopom Nikon Eclipse Ni-UM, opremljenim s kamero DS-Fi1 in programsko opremo NIS-Elements BR 4.60 (Nikon Instruments Europe BV, Badhoevedorp, Nizozemska). Vidna polja na zaporednih rezinah smo zajemali pri povečavi objektiva 4x. Deleže posameznih tipov vlaken (tip I, IIa, IIx in IIb) v LD in SSC smo določili na podlagi rezultatov encimskega in imunohistokemičnega obarvanja vlaken, kot je predstavljeno v tabeli 6. Za vsako žival smo na slikah zaporednih rezin v treh do

šestih zaključenih mišičnih snopičih analizirali od 400 do 500 skeletnomišičnih vlaken. Vlakna posameznega tipa smo prešteli in jim določili tip, za kar smo uporabili iste mišične snopiče na zaporednih rezinah. Vlakna z visokim oksidativnim potencialom, tj. z močno pozitivno reakcijo SDH (vlakna tipa I in IIa), smo označili kot SDH ++ (tabela 3).

Vsem razvrščenim vlaknom smo izmerili tudi površino prečnega prerez (iz angl. cross sectional area (CSA), μm^2) in za vsako žival po spodnji enačbi izračunali relativno površino posameznega tipa vlaken v proučevanih mišicah.

$$\text{Eračba [1]} \quad \text{Relativna površina vlaken (\%)} = \frac{\text{CSA} \times \text{delež posameznega tipa vlaken}}{\text{povprečni CSA vseh vlaken}}$$

Tabela 3: Aktivnost sukkinske dehidrogenaze (SDH) in specifičnost uporabljenih primarnih protiteles, ki so podlaga za encimsko-/imunohistomemično razvrstitev skeletnomišičnih vlaken v tip I, IIa, IIx in IIb.

Table 3: Summary of intensity of the succinate dehydrogenase (SDH) activity and specificity of utilized primary antibodies supporting the enzyme-/immuno-histochemistry based myofiber classification into types I, IIa, IIx, and IIb.

Metoda	Tip vlaken			
	I	IIa	IIx	IIb
SDH	++	++	+	-
NLC-MHCs (slow)	++	-	-	-
SC 71	-	++	+	-

++ močno pozitivna reakcija; + zmerno pozitivna reakcija; - negativna reakcija.

++ strong positive reaction; + moderate positive reaction; -negative reaction.

3.2.3 Izolacija celotne RNA, sinteza cDNA in kvantitativna verižna reakcija s polimerazo (qPCR)

Izolacija celotne RNA iz zamrznjenih vzorcev mišic LD in SSC, predhodno shranjenih na -80°C , sinteza cDNA in kvantitativna verižna reakcija s polimerazo (qPCR) so potekale, kot je bilo

predhodno opisano (22). Z metodo qPCR smo določali prisotnost informacijske mRNA (iz angl. messenger RNA) za izoforme MCH, lipoproteinsko lipazo (LPL), heksokinazo 2 (HK2), receptor, aktiviran s proliferatorjem peroksisomov γ (PPAR γ), koaktivator 1 alfa PPAR γ (PGC-1 α) in G-protein $\alpha 13$ (G α 13). Celotno RNA smo izolirali iz ~ 25 mg mišičnega tkiva vzorcev LD in SSC s komercialno dosegljivim kitom RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (Qiagen, Stockach, Nemčija) in pri delu upoštevali navodila proizvajalca. Genomsko DNA smo iz vzorca izolirane celotne RNA ostranili z DNazo (RNase-Free DNase Set (Qiagen, Stockach, Nemčija). Koncentracijo in čistost izolirane RNA smo določili spektrofotometrično (spektrofotometer UV–VIS Lambda 25 Perkin Elmer, Waltham, MA, ZDA) z meritvami optične gostote (OD) razredčenih vzorcev RNA pri valovni dolžinah 230, 260 in 280 nm. Koncentracijo RNA smo izračunali tako, da smo vrednost OD pri 260 nm pomnožili s faktorjem razredčitve in vrednostjo 40 (40 µg RNA/ml ima OD₂₆₀ = 1). Izračunano razmerje OD 260/280 in 260/230 je služilo za oceno čistosti RNA. Vzorce RNA z razmerjem OD 260/280 in 260/230, večjim od 1,8, smo uporabili za nadaljnje delo. V primeru nižjega razmerja smo izolacijo celotne RNA ponovili. V postopku obratnega prepisovanja RNA v komplementarno DNA (cDNA) smo 1 µg RNA prepisali v cDNA. Uporabili smo komplet reagentov RT² First Strand Kit (Qiagen, Stockach, Nemčija) in sledili navodilom proizvajalca. Po končani sintezi v aparaturi SimpliAmp™ Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, ZDA) smo cDNA shranili pri –20 °C. Sledile so analize qPCR, ki smo jih izvedli na aparatu QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific, Applied Biosystems, Foster City, CA, ZDA). Uporabili smo začetne oligonukleotide in fluorescenčne sonde za proučevane gene (6-FAM dye-labeled minor groove binder (vezalec malega žleba — MGB) probes), ki so bili ali izdelani po naročilu (Assay-by-Design Service) ali komercialno dostopni pri ThermoFisher Scientific (informacije so zbrane v Tabeli 4. Izražanje evkariotske ribosomalne (r) 18S RNA (18S rRNA) in aktina beta (ACTB) smo uporabili kot endogeni kontroli, saj je bila njuna primernost za normalizacijo podatkov qPCR za mišične vzorce pri prašičih že prehodno potrjena (31, 44). Reakcijska mešanica (končni volumen 10 µl) za qPCR je vsebovala 10-krat razredčene vzorce cDNA, začetne oligonukleotide in fluorescenčne sonde ter univerzalno mešanico PCR (TaqMan® Universal PCR Master Mix; ThermoFisher Scientific, Applied Biosystems). Vse reakcije smo izvedli pri pogojih 2 min pri 50 °C in 10 min pri 95 °C, nato pa 45 ciklov pri pogojih 15 s pri 95 °C in 1 min pri 60 °C v 96-jamičnih optičnih ploščah (ThermoFisher Scientific), ki smo jih prekrili z adhezivnimi folijami (ThermoFisher Scientific). Vsak vzorec smo analizirali v treh ponovitvah.

Analizo rezultatov smo opravili v programu Relative Quantification Analysis Module, version 3.9 (ThermoFisher Scientific, Applied Biosystems). Program za vsako jamico izriše graf krivulje pomnoževanja skozi cikle reakcije. Ciklus reakcije qPCR, pri katerem se intenzivnost fluorescence loči od ozadja, tj. prazni cikel (angl. threshold cycle – Ct) smo določili pri 0,1. Vrednost Ct, večja od 40, je bila določena kot mejna vrednost za zaznavanje ekspresije gena. Izražanje genov smo normalizirali glede na geometrijsko povprečje dveh kontrolnih genov (18s rRNA in aktina beta). Kvantitativne vrednosti cDNA smo nato izračunali z uporabo komparativne Ct-metode (ΔCt).

$$\Delta Ct = Ct \text{ (geometrijsko povprečje kontrol)} - Ct \text{ (tarčni prepis)}.$$

Za ugotavljanje relativnih razlik v izražanju mRNA proučevanih genov med spolnimi kategorijami znotraj LD ali SSC ali med LD in SSC smo uporabili metodo relativne kvantifikacije $2^{\Delta\Delta Ct}$ (45), ki pove, kolikokrat (angl. fold change) se izražanje gena v vzorcu spremeni v primerjavi s primerjanim vzorcem (kalibratorjem). Kot mejo veljavnosti relativne kvantifikacije smo določili najmanj dvakratno spremembo v izražanju genov – $2^{\Delta\Delta Ct} \geq 2$ ali $\leq 0,5$. Učinkovitost qPCR proučevanih genov je bila $> 90\%$ in je bila pridobljena iz standardnih krivulj štirih razredčin cDNA (1 : 10, 1 : 100, 1 : 1000, 1 : 10 000).

Tabela 4: Informacije o začetnih oligonukleotidih in sondah (A) ter predhodno razvitih testih (B), uporabljenih za qPCR.

Table 4: Information on the primers (A) and predeveloped assays (B) used for qPCR.

A

Prepis	Okrajšava	Zaporedje oligonukleotidov/sond (5'→3')
težka miozinska veriga I	MyHC I	F: CGTGCTCCGTCCTCTTCCCTT R: GAAGAAAGAGGGCTCAAGCTGGAA P: FAM-CTGCTCTCAGGCC
težka miozinska veriga 2a	MyHC 2a	F: GTCCTGCTTAAAAAGCTCCAAGAA R: AGAGGTCCCTCTTAGCAAGTGA P: FAM-CAGGCTGCATCTC
težka miozinska veriga 2x	MyHC 2x	F: GCTTCAAGTTCTGCCCACTT R: TGGCAGCCCAGTCAAAGAC P: FAM-CTTGAGATGCAACCTTG
težka miozinska veriga 2b	MyHC 2b	F: AACACTTAAGTAGTTGTCTGCCTTGA R: AGGGCACTAGATGTACCTCTTATGT P: FAM-CCTGCCACCGTCTTC
G-protein α 13 (G α 13)	G α 13	F: 5-GCAGACAGTGGCATACAGAATG R: 5- CTCCAAGTTATCCAAGTTATCCAGGAAA P: 5- TCACCCAAC TGAAATTG

F = smerni začetni oligonukleotid; R = protismerni začetni oligonukleotid; P = sonda.

F = forward primer; R = reverse primer; P = probe.

B

Prepis	Okrajšava	Oznaka testa
receptor, aktiviran s proliferatorjem peroksisomov γ	PPAR γ	Ss03394829_m1
koaktivator 1 alfa PPAR- γ	PGC-1 α	Ss03393114_u1
lipoproteinska lipaza	LPL	Ss03394612_m1
heksokinaza 2	HK2	Ss03390132_m1
aktin, beta	ACTB	Ss03376081_u1
evkariotska ribosomalna (r) 18S RNA	18S rRNA	Hs03003631_g1

3.2.4 Statistična analiza

Podatke smo statistično obdelali z analizo variance in uporabo programa SAS/STAT® (SAS Institute Inc., Cary, NC, ZDA). Uporabili smo splošni linearni model (GLM) in srednje vrednosti, ocenjene po metodi najmanjših kvadratov (LSM; okrajšano iz angl. least square mean). Model je vključeval nespremenjen vpliv spolne kategorije (EM, SC, IC). Eksperimentalna enota je bila žival. V primeru značilnega vpliva spolne kategorije ($P < 0,05$) smo te primerjali s *post hoc* testom Tukey. Statistične razlike v proučevanih parametrih med mišicama LD in SSC smo določili s Studentovim parnim t-testom. Razlike med mišicama, pri katerih je vrednost $P < 0,05$, smo ovrednotili kot značilne. Za ugotavljanje korelacij med proučevanimi lastnostmi smo uporabili statistični programski paket R (46).

4 REZULTATI

4.1 Podatki o prašičih, vključenih v raziskavo

Osnovni podatki o prašičih, vključenih v raziskavo, so prikazani v tabeli 5. Gre za podvzorec (en turnus oziroma serija zakola) 36 prašičev treh spolnih kategorij od skupno 144, ki so bili vključeni v raziskavo, ki so jo izvedli nemški partnerji pri projektu (38). Poskusne živali EM so se razlikovale od SC v masi klavnih trupov, debelini podkožne maščobe in deležu pustega mesa, medtem ko se vrednosti pri IC niso značilno razlikovale niti od EM niti od SC.

Tabela 5: Osnovni podatki o prašičih posameznih spolnih kategorij, vključenih v raziskavo.

Table 5: Basic information on pigs included in the study according to sex category.

	EM	IC	SC	RMSE	P-vrednost
Živa masa prašičev (kg)	117,8	126,5	126,7	10,36	0,069
Masa trupov (kg)	94,2 ^a	101,2 ^{ab}	103,6 ^b	8,63	0,032
Debelina podkožne maščobe (mm)¹	11,1 ^a	13,9 ^{ab}	15,9 ^b	2,84	0,002
Delež pustega mesa (%)²	61,9 ^b	60,2 ^{ab}	58,6 ^a	2,76	0,025

Navedene so ocenjene srednje vrednosti (LSM); RMSE: koren povprečne kvadratne napake; EM: merjasci; IC: imunokastrati; SC: kirurški kastrati; n = 12 na posamezno spolno kategorijo; ^{a, b} vrednosti, ki so v isti vrstici označene z različnimi nadpisanimi črkami, se značilno razlikujejo ($P < 0,05$; analiza variance s *post hoc* testom Tukey). ¹ – merjeno med drugim in tretjim zadnjim rebrom 7 cm lateralno na linijo razseka; ² – določen z aparatom Fat-O-Meat'er (Frontmatec, Klodin, Denmark) in priznano enačbo za nemške klavnice (28).

Values are given as least square means (LSM); RMSE: root-mean-square error RMSE; EM: entire males; IC: immunocastrates; SC: surgical castrates; n = 12 per sex category group; ^{a,b} means within a row with different superscript letter differ ($P < 0.05$; one-way ANOVA followed by *post hoc* Tukey test).

4.2 Značilnosti proučevanih mišic – primerjava LD in SSC

V raziskavi smo uporabili mišici z značilno kemično sestavo, kontraktilno-presnovnimi in morfometričnimi značilnostmi. LD je bela mišica, v kateri prevladujejo hitro krčljiva glikolitična mišična vlakna, SSC je rdeča mišica s prevladujočim deležem počasi krčljivih oksidativnih vlaken. To potrjuje tudi primerjava naših rezultatov, saj se večina proučenih parametrov med mišicama značilno razlikuje (tabeli 6 in 7 ter slika 8). V primerjavi z LD je bila v SSC vsebnost IMF značilno višja, vsebnost vode in beljakovin pa značilno nižja (tabela 6). Tudi encimska in imunohistokemična razvrstitev vlaken LD in SSC (slika 8) in rezultati histomorfometrične analize (tabela 6) potrjujejo značilen kontraktilni in presnovni fenotip proučevanih mišic. V LD prevladujejo glikolitična vlakna tipa IIb, sledijo vlakna IIx, IIa in I. Vlakna IIb imajo največji CSA in njihova relativna površina v LD znaša skoraj 75 %. Nasprotno v SSC prevladujejo oksidativna (SDH++) vlakna tipa I in II, ki predstavljajo več kot 70 % vlaken, njihov CSA je približno dvakrat večji kot istovrstnih vlaken v LD. Razlike med mišicama smo ugotovili tudi v izražanju mRNA izbranih genov, povezanih s kontraktilnim (MyHC I, IIa, IIx in IIb) in presnovnim fenotipom oz. kakovostjo mesa ali sposobnostjo indukcije preobrazbe skeletnomišičnih vlaken (PGC-1 α , PPAR γ , LPL, HK2 in G α 13) (tabela 7). Relativne razlike v izražanju izoform MyHC na ravni mRNA med LD in SSC se večinoma skladajo z encimsko in imunohistokemično razvrstitvijo vlaken. Na podlagi encimske in imunohistokemije v SSC nismo identificirali čistih vlaken IIb (tabela 6), kar je skladno z analizo qPCR, s katero smo v SSC ugotovili okoli 1000-krat nižjo raven mRNA za MyHC IIb v primerjavi z LD (tabela 7). Raven izražanja PGC-1 α , PPAR γ , LPL, HK2 je v LD znatno nižja v primerjavi s SSC, medtem ko razlik v izražanju G α 13 med mišicama nismo ugotovili.

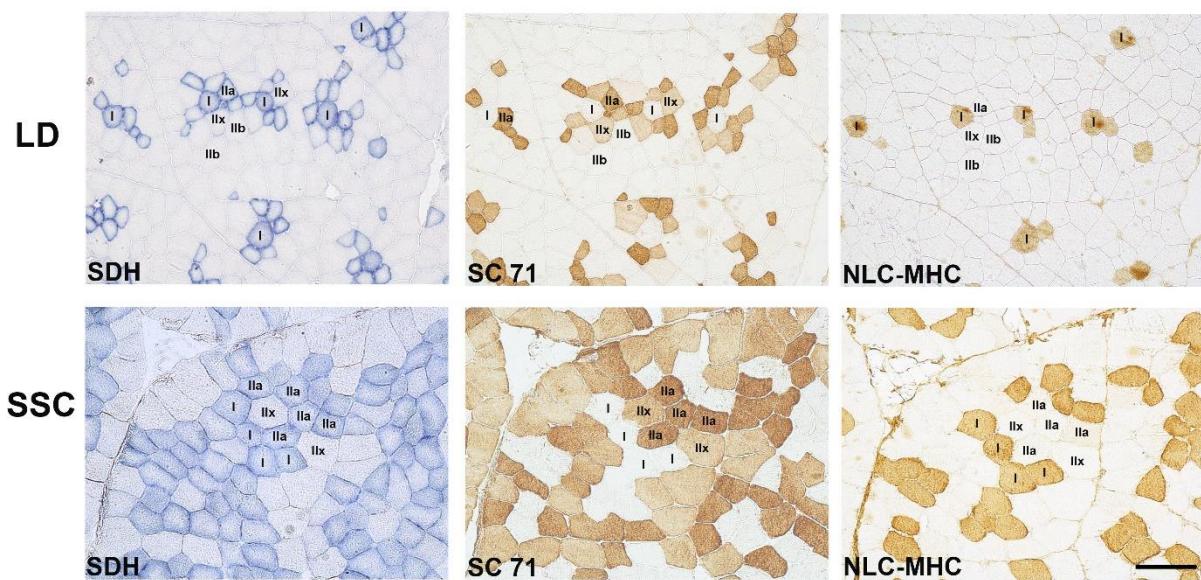
Tabela 6: Kemična sestava, deleži in histomorfometrične lastnosti vlaken najdaljše hrbtne mišice (LD) in poltrnove mišice glave (SSC).

Table 6: Chemical composition, myofiber types profile and histomorphometric characteristics of longissimus dorsi (LD) and semispinalis capitis (SSC).

	Mišica		
	LD	SSC	P-vrednost
Kemična sestava			
IMF (%)	1,7 ± 0,6	7,1 ± 1,6	<0,001
voda (%)	73,7 ± 0,8	72,1 ± 1,6	<0,001
beljakovine (%)	24,7 ± 0,7	20,5 ± 0,9	<0,001
Delež vlaken (%)			
tip I	8,7 ± 2,2	38,6 ± 6,3	< 0,001
tip IIa	10,6 ± 3,1	34,2 ± 4,4	< 0,001
tip IIx	16,6 ± 5,4	27,2 ± 3,9	< 0,001
tip IIb	64,1 ± 8,0	ND	–
SDH ++	19,3 ± 4,0	72,8 ± 4,0	< 0,001
CSA (μm^2)			
tip I	3777 ± 889	7216 ± 1214	< 0,001
tip IIa	2998 ± 591	6046 ± 1600	< 0,001
tip IIx	5797 ± 1192	7370 ± 2032	< 0,001
tip IIb	7609 ± 1486	ND	–
vsa vlakna	6464 ± 1133	6868 ± 1157	ns
Relativna površina vlaken (%)			
tip I	5,2 ± 1,8	40,8 ± 7,7	< 0,001
tip IIa	5,0 ± 1,8	30,0 ± 5,7	< 0,001
tip IIx	15,0 ± 5,4	29,2 ± 5,7	< 0,001
tip IIb	74,8 ± 7,4	ND	–

Navedene so srednje vrednosti ± SD; n = 36 na mišico; IMF – intramuskularna maščoba; CSA – površina prečnega prereza; ND – ni zaznan; ns – neznačilno (Student t-test; P > 0,05).

Data are given as mean ± SD; n = 36 per muscle. IMF – intramuscular fat; CSA – cross sectional area; ND – not detected; ns – not significant (Student t-test; P > 0.05).



Slika 8: Encimska in imunohistokemična razvrstitev skeletnomišičnih vlaken najdaljše hrbtne mišice (LD) in poltrnove mišice glave (SSC). V zgornji vrsti so prikazane zaporedne prečne rezine LD in v spodnji SSC. Aktivnost mitohondrijske sukcinske dehidrogenaze (SDH) prikazuje oksidativni potencial skeletnomišičnih vlaken, ki je visok v oksidativnih vlaknih tipa I in IIa, zmeren v presnovno vmesnem IIx in nezaznaven v vlaknih tipa IIb. Imunohistokemično dokazovanje prisotnosti izoform MyHC z Mab SC 71, ki se specifično veže na MyHC IIa, da močno pozitivno reakcijo v vlaknih IIa in zmereno v vlaknih IIx, medtem ko je reakcija z NLC-MHC (slow; počasen), specifičnim za MyHC I, pozitivna le v vlaknih tipa I. Merilo = 200 μ M.

Figure 8: Enzyme-/immuno-histochemical classification of myofiber types in of the *longissimus dorsi* (LD) and *semispinalis capititis* (SSC) muscle. Transverse sections of the LD (upper panels) and SSC (lower panels) muscle analyzed for succinate dehydrogenase (SDH) activity demonstrating the oxidative profile of myofibers that is high in type I and IIa, moderate in metabolic intermediate IIx and undetectable in type IIb myofibers. Immunohistochemical staining with the monoclonal antibodies SC 71 specific for MyHC IIa gives a strong positive reaction in myofiber IIa and moderate IIx, whereas the reaction with NLC-MHCs (slow) specific for MyHC I is positive only in type I myofibers. Scale bar = 200 μ M.

Tabela 7: Primerjava izražanja izbranih genov v najdaljši hrbtni mišici (LD) in poltrnovi mišici glave (SSC).

Table 7: Comparison of genes expression related to the contractile and metabolic phenotype in the *longissimus dorsi* (LD) and *semispinalis capitis* (SSC).

LD vs. SSC		
Tarčni prepis	Razlika v izražanju	P-vrednost
MyHC I	-7,26 (od -10,44 do -5,04)	< 0,0001
MyHC IIa	-5,32 (od -6,84 do -4,13)	< 0,0001
MyHC IIx	1,45 (od 1,12 do 1,86)	0,034
MyHC IIb	1072 (od 758 do 1514)	< 0,0001
PPARγ	-2,50 (od -3,27 do -1,91)	0,013
PGC-1α	-9,51 (od -12,72 do -7,11)	< 0,0001
Ga13	-1,39 (od -1,67 do -1,15)	ns
HK2	-4,48 (od -5,95 do -3,37)	< 0,0001
LPL	-3,79 (od -4,69 do -3,07)	< 0,0001

Navedene so povprečne razlike v izražanju genov (angl. fold change) z zgornjo in spodnjo mejo za LD v primerjavi s SSC. Razlike v izražanju, manjše od 1, smo nadomestili z negativno inverzno vrednostjo prvotne spremembe. Zgornja in spodnja meja sta bili izračunani za vsako razliko v izražanju z uporabo standardne napake srednje vrednosti. Ns – neznačilno (Student t-test; P > 0,05).

Given are the mean fold changes with upper and lower limits in genes expression for LD compared with the SSC. A fold-change value less than 1 was replaced by a negative inverse of the original fold-change value. Upper and lower limits were calculated for each fold-change value using the standard error of the mean. ns – not significant (Student t-test; P > 0.05).

4.3 Kemična sestava, deleži in histomorfometrične lastnosti vlaken najdaljše hrbtne mišice (LD) in poltrnove mišice glave (SSC) – vpliv spolne kategorije

Vpliv spolne kategorije oz. dolgo- in kratkotrajne androgene deprivacije na kemično sestavo, deleže in histomorfometrične lastnosti vlaken LD in SSC je prikazan v tabeli 8. Razlike v kemični sestavi so značilne predvsem med EM in SC. V LD in SSC je značilna razlika v vsebnosti vode, ki je višja pri EM v primerjavi s SC (LD) ter v primerjavi s SC in IC (SSC). Značilne so tudi razlike v vsebnosti IFM v SSC, ki je pri EM značilno nižja v primerjavi s SC. Učinka imunokastracije na deleže vlaken nismo ugotovili. V primerjavi s SC pa je pri EM značilno višji delež vlaken tipa IIa in tudi delež oksidativnih vlaken SHD++. Nasprotno pa histomorfometrična analiza kaže vpliv imunokastracije na posamezne morfometrične parametre, predvsem površino oksidativnih vlaken v SSC. V SSC je pri IC značilno zmanjšan CSA vlaken tipa I v primerjavi z EM in SC. Značilne so tudi razlike v relativni površini vlaken tipa I in IIa. V SSC je pri IC relativna površina vlaken tipa I značilno nižja, vlaken tipa IIa pa višja v primerjavi z EM. Trendi pri morfometričnih parametrih vlaken tipa I v LD so podobni kot v SSC (zmanjšana CSA in relativna površina vlaken v primerjavi z EM in SC), vendar ne dosežejo statistične značilnosti ($P > 0,05$ in $< 0,1$).

Tabela 8: Kemična sestava, deleži in histomorfometrične lastnosti vlaken najdaljše hrbtne mišice (LD) in poltrnove mišice glave (SSC) glede na spolno kategorijo.

Table 8: Chemical composition, myofiber types profile and histomorphometric characteristics of longissimus dorsi (LD) and semispinalis capitis (SSC) muscle according to sex category.

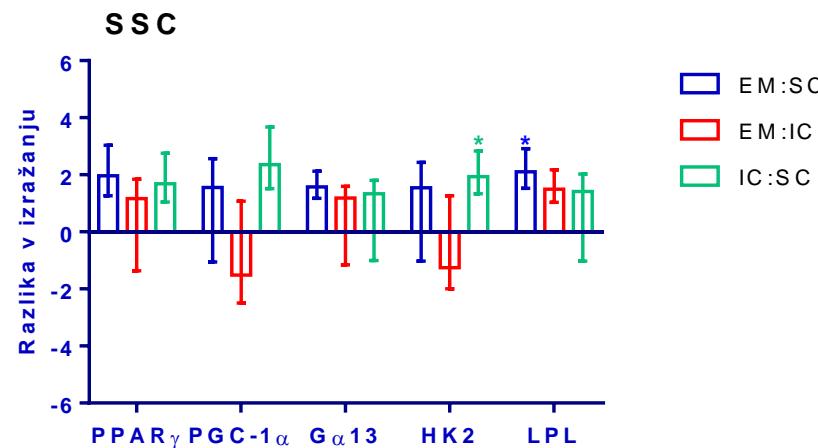
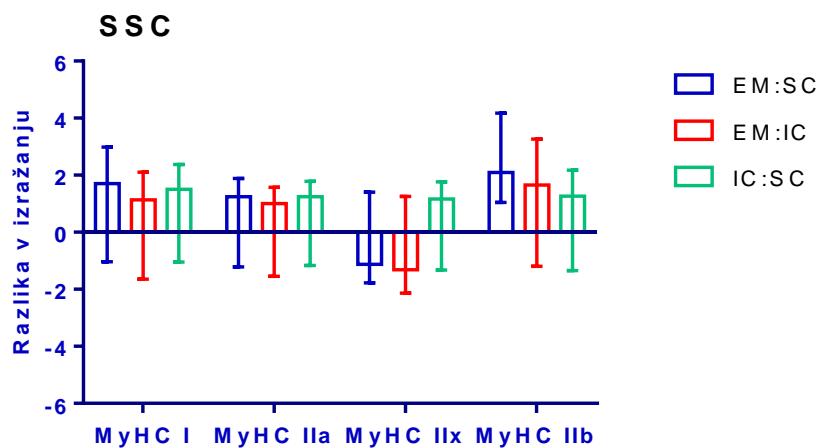
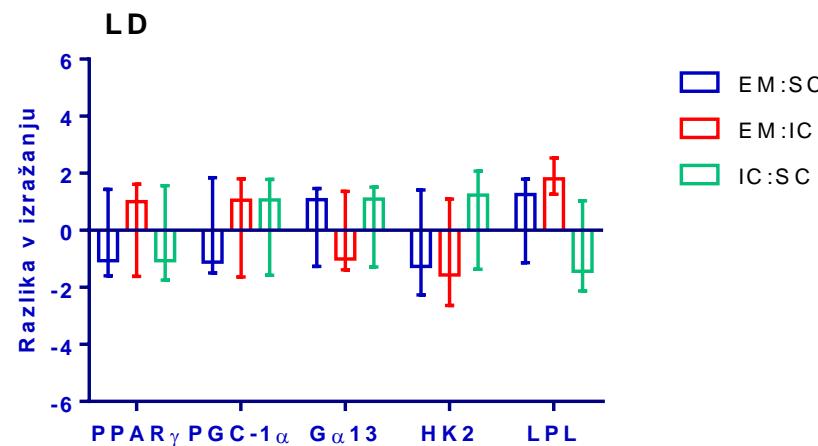
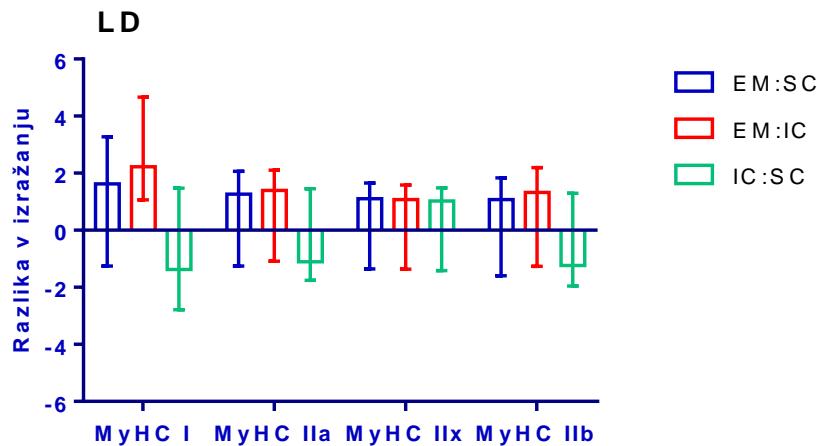
	LD				P-vrednost	SSC				RMSE	P-vrednost
	EM	IC	SC	RMSE		EM	IC	SC			
Kemična sestava											
IMF (%)	1,4	1,7	1,8	0,61	0,286	6,1 ^a	7,4 ^{ab}	7,7 ^b	1,44	0,030	
voda (%)	74,2 ^b	73,6 ^{ab}	73,2 ^a	0,68	0,004	73,3 ^b	71,6 ^a	71,1 ^a	1,35	0,001	
proteini (%)	24,2 ^a	24,8 ^{ab}	24,8 ^b	0,57	0,021	20,4	20,7	20,3	0,92	0,564	
Delež vlaken (%)											
tip I	9,3	8,0	8,8	2,16	0,319	41,0	37,9	37,2	6,42	0,323	
tip IIa	12,1 ^b	11,0 ^{ab}	8,8 ^a	2,78	0,018	32,6	34,8	35,0	4,32	0,342	
tip IIx	17,3	17,9	14,8	5,32	0,320	26,40	27,3	27,8	4,03	0,693	
tip IIb	61,3	63,1	67,7	7,77	0,130	—	—	—	—	—	
SDH ++	21,4 ^b	19,0 ^{ab}	17,5 ^a	3,80	0,050	73,6	72,7	72,2	4,03	0,693	
CSA (μm^2)											
tip I	4185	3393	3754	851	0,089	7584 ^b	6291 ^a	7773 ^b	1044	0,003	
tip IIa	3047	3085	2864	600	0,632	5706	5997	6436	1387	0,440	
tip IIx	6194	5545	5653	1192	0,372	7699	7225	7187	1629	0,695	
tip IIb	8083	7403	7342	1489	0,410	—	—	—	—	—	
vsa vlakna	6721	6258	6413	1150	0,609	7024	6418	7162	1143	0,252	
Relativna površina vlaken (%)											
tip I	6,0	4,3	5,1	1,7	0,065	44,7 ^b	37,1 ^a	40,6 ^{ab}	7,28	0,050	
tip IIa	5,5	5,5	4,1	1,7	0,080	26,4 ^a	32,3 ^b	31,4 ^{ab}	5,15	0,017	
tip IIx	15,9	15,8	13,4	5,5	0,469	29,0	30,6	28,0	5,76	0,533	
tip IIb	72,6	74,4	77,3	7,4	0,296	—	—	—	—	—	

Navedene so ocenjene srednje vrednosti (LSM); RMSE: koren povprečne kvadratne napake; n = 12 na posamezno spolno skupino; EM: merjasci; IC – imunokastrati; SC – kirurški kastrati; IMF – intramuskularna maščoba; CSA – površina prečnega prerez ^{a, b} vrednosti, ki so v isti vrstici označene z različnimi nadpisanimi črkami, se značilno razlikujejo med spolnimi kategorijami znotraj posamezne mišice (LD ali SSC) ($P < 0,05$; analiza variance s *post hoc* testom Tukey).

Values are given as least square means (LSM); RMSE: root-mean-square error; n = 12 per muscle in sex category; in total n = 72; EM: entire males; IC: immunocastrates; SC: surgical castrates. IMF – intramuscular fat; CSA – cross sectional area; ^{a,b} means within a row with different superscript letter differ significantly among sex categories within a muscle (LD or SSC) ($P < 0.05$; one-way ANOVA followed by *post hoc* Tukey test).

4.4 Raven izražanja izbranih genov v najdaljši hrbtni mišici (LD) in poltrnovi mišici glave (SSC) – vpliv spolne kategorije

Rezultati vpliva hormonskega statusa na izražanje izbranih genov v LD in SC med kategorijami prašičev so prikazani na grafu 1. V nobeni od proučevanih mišic nismo ugotovili značilnih razlik v izražanju izoform MyHC, povezanih s kontraktilnim fenotipom skeletnomišičnih vlaken med proučevanimi kategorijami prašičev. Vpliv kratkotrajne androgene deprivacije z imunokastracijo smo ugotovili samo v povišanem izražanju mRNA za glikolitični encim HK2 med IC in SC v SSC. V SSC smo ugotovili tudi višjo raven izražanja mRNA za encim, vključen v lipidno presnovo (LPL), pri EM v primerjavi s SC. Značilnih razlik v izražanju genov, ki jih povezujejo s kakovostjo mesa (PPAR γ in PGC-1 α), ali sposobnostjo indukcije preobrazbe glikolitičnih vlaken v oksidativna (PGC-1 α in G α 13), nismo ugotovili. Pri IC je v SSC povišano izražanje PGC-1 α v primerjavi s SC, vendar razlike ne dosežejo statistične značilnosti ($P > 0,05$ in $< 0,1$).

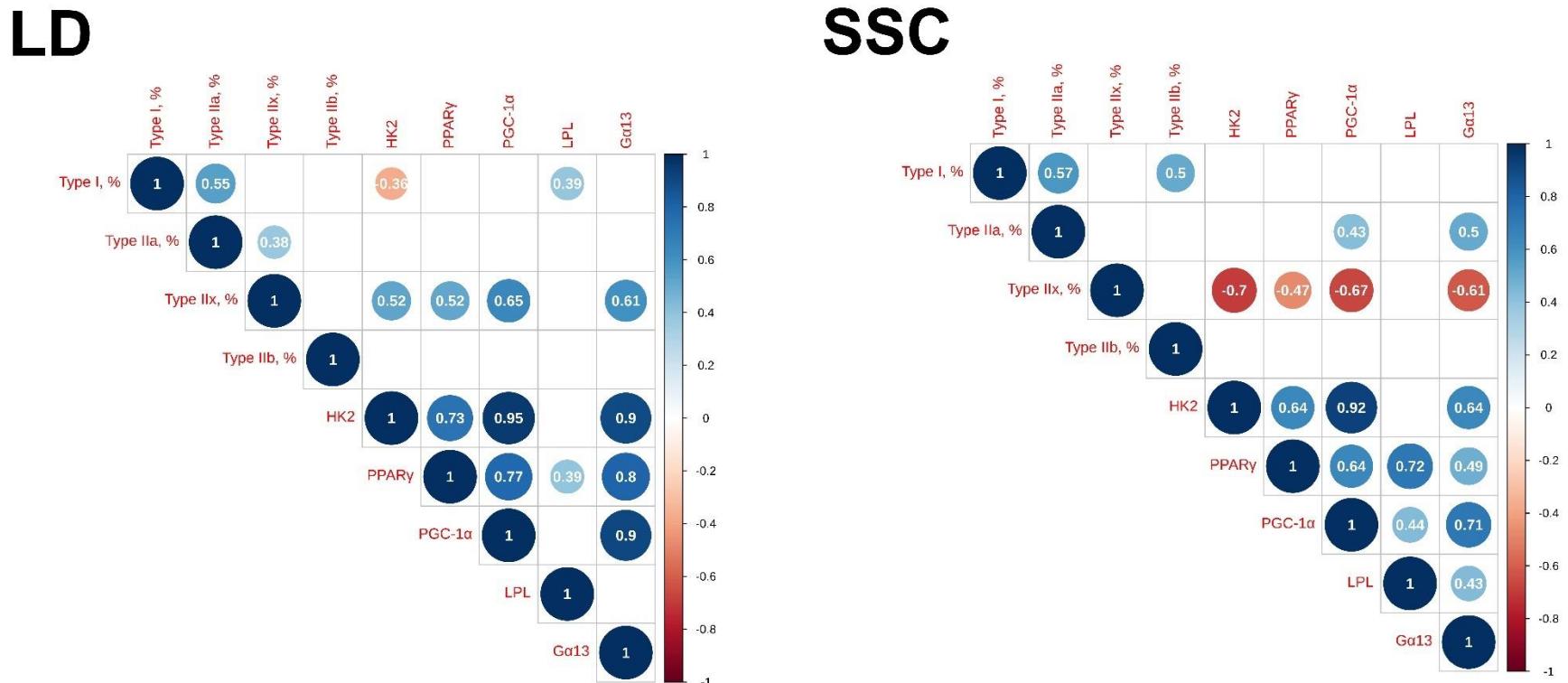


Graf 1: Primerjava izražanja izbranih genov v najdaljši hrbtni mišici (LD) in poltrnovi mišici glave (SSC) med spolnimi kategorijami. Navedene so povprečne razlike v izražanju genov (angl. fold change) z zgornjo in spodnjo mejo za EM v primerjavi s SC (EM:SC) in IC (EM:IC) ter za IC v primerjavi s SC (IC:SC). Razlike v izražanju, manjše od 1, smo nadomestili z negativno inverzno vrednostjo prvočne spremembe. Zgornja in spodnja meja sta bili izračunani za vsako razliko v izražanju z uporabo standardne napake srednje vrednosti. * – značilne razlike med primerjanima skupinama (Student t-test; $P > 0,05$).

Figure 1: Comparison of genes expression related to the contractile and metabolic phenotype in the longissimus dorsi (LD) and semispinalis capitis (SSC) among sex categories. Given are the mean fold changes with upper and lower limits in expression for EM in comparison to SC (EM:SC) and IC (EM:IC) and IC in comparison to SC (IC:SC). A fold-change value less than 1 was replaced by the negative inverse of the original fold change value. Upper and lower limits were calculated for each fold-change value using the standard error of the mean. *; significantly different between compared sex categories ($P < 0.05$; Student t-test).

4.5 Korelacijske analize

Med številčnimi deleži tipov vlaken in geni, povezanimi s presnovnim fenotipom (HK2 in LPL) mišic, ter tistimi, ki jih povezujejo s kakovostjo mesa (PPAR γ in PGC-1 α), ali sposobnostjo indukcije preobrazbe glikolitičnih vlaken v oksidativna (PGC-1 α in G α 13), nismo ugotovili značilnih korelacji. V obeh mišicah se je potrdila pozitivna korelacija med izražanjem G α 13 in PGC-1 α , PPAR γ in HK2, v SSC pa tudi z LPL. V LD je delež vlaken tipa I v negativni korelaciiji s HK2 in pozitivni korelaciiji z LPL. Razlike med LD in SSC smo ugotovili predvsem pri korelaciiji deleža vlaken IIx in izražanjem HK2, PPAR γ , PGC-1 α in G α 13. Te korelacije so v LD pozitivne, v SSC pa negativne. Delež vlaken IIa je v SSC v pozitivni korelaciiji z izražanjem PGC-1 α in G α 13 (graf 2).



Graf 2: Korelacijska analiza med številčnim deležem vlaken in izražanjem genov. Velikost in barva kroga označujeja moč korelacije in njeno smer. Prikazane so samo značilne korelacije, njihove vrednosti pa so navedene znotraj krogov.

Figure 2: The correlation analysis between proportion of individual myofiber type and gene expression.. The size and color of the circle denote the strength of the relationship and its direction. Only the significant correlations are represented, and the values of the correlation are given inside the circles.

5 RAZPRAVA

Z naložo smo proučili vpliv dolžine androgene deprivacije na zastopanost in histomorfometrične lastnosti tipov mišičnih vlaken dveh presnovno različnih mišic (LD in SSC). Določili smo kemično sestavo mišic z infrardečo spektroskopijo, opravili histokemično in morfometrično karakterizacijo vlaken ter s qPCR analizirali izražanje genov, povezanih s kontraktilnim (MyHC I, IIa, IIx in IIb) in presnovnim fenotipom oz. kakovostjo mesa ali sposobnostjo indukcije preobrazbe skeletnomišičnih vlaken (PGC-1 α , PPAR γ , LPL, HK2 in G α 13). Vplive starosti, pasme, reje in prehrane lahko izključimo, saj so bili vsi prašiči vključeni v raziskavo primerljive starosti, pasme in sočasno vzrejani pod enaki pogoji.

V predhodni raziskavi je bila potrjena tudi uspešnost imunokastracije, ki je bila v našem poskusu 100-odstotna (38), kar potrjuje izrazita regresija spolnih organov pri IC. Vsi IC so imeli značilno nižjo maso mod z nadmodki in pomožnih spolnih žlez ter serumsko vrednost testosterona v primerjavi z EM. Do padca ravni testosterona pride pri IC šele po drugi vakcinaciji (laboratorijsko potrjena v starosti 24 tednov in ob zakolu). Dolžina androgene deprivacije je zato pri IC kratkotrajna (4–6 tednov), medtem ko je pri SC dolgotrajna, saj so kastrirani v prvem tednu po skotitvi, pri IC in EM pa je prvo večje povečanje testosterona ugotovljeno že pred prvo vakcinacijo, pri starosti 12 tednov (38). Uspešnost imunokastracije so dodatno potrdile tudi prisotnost protiteles proti GnRH v krvni plazmi ter vsebnosti skatola in androstenona v podkožnem maščobnem tkivu, ki so bile pod mejo, ki velja za prag senzorične zaznave (38).

Naši rezultati ne potrjujejo značilnega vpliva imunokastracije na lastnosti klavnih trupov (masa, debelina podkožne maščobe in delež pustega mesa) in kemično sestavo mišic (vsebnost beljakovin, vode in IMF). Večina teh parametrov se je značilno razlikovala le med EM in SC. Pridobljeni podatki o telesni sestavi eksperimentalnih živali se skladajo z izsledki sistematičnega pregleda oz. metaanalize predhodno objavljenih študij o vplivu imunokastracije na proizvodne in klavne lastnosti ter kakovost mesa prašičev med EM, SC in IC (29, 47).

Študij o vplivu dolžine androgene deprivacije na kontraktilno-presnovne in morfometrične lastnosti skeletnomišičnih vlaken, ni veliko, čeprav te lastnosti pomembno vplivajo tudi na kazalnike kakovosti mesa (48). Mišična vlakna in njihova zastopanost določa funkcijo in

kvalitativne lastnosti mišice in s tem mesa. Obstaja povezava med kakovostjo mesa in zastopanostjo mišičnih vlaken različnih tipov, vendar gre za kompleksne interakcije genetskih in okoljskih dejavnikov. Pregled literature (49) za prašiče kaže, da je povečan delež hitro krčljivih vlaken IIb in večja površina mišičnih vlaken negativno povezana z lastnostmi kakovosti mesa, tako tehnoloških, ki so pod vplivom narave posmrtnne glikolize (znižanja pH), kot senzoričnih (sočnost, mehkoba in okus). Nasprotno pa povečan delež vlaken tipa I kaže na pozitiven vpliv na kakovost mesa.

S primerjavo rezultatov analiz obeh mišic smo najprej potrdili značilno kemično sestavo in kontraktilno-presnovni fenotip proučevanih mišic. Razlike v deležu vlaken v LD in SSC so bile pričakovane in se skladajo s predhodno študijo, v kateri so prav tako poročali o skoraj petkrat večjem deležu vlaken tipa I v SSC v primerjavi z LD (50). Delež hitro krčljivih glikolitičnih vlaken se sklada tudi z encimskohistokemično klasifikacijo vlaken komercialnih križancev LW × pietrain (51), ki so bili uporabljeni tudi v naši raziskavi. Od dva- do trikrat večji CSA oksidativnih vlaken tipa I in IIa v SSC v primerjavi z istovrstnimi vlakni v LD potrjuje, da velikost oz. CSA ni pogojen/-a samo s tipom vlakna (52). Različni dražljaji, kot so kontraktilna aktivnost, mehanska obremenitev, raven celične energije in preskrba s kisikom, vplivajo na velikost vlaken. Pomanjkanje preskrbe s kisikom (hipoksija) in nizka raven celične energije zmanjšujeta sintezo in povečujeta razgradnjo mišičnih proteinov, nasprotno pa normoksični pogoji in visoka raven celične energije spodbujajo hipertrofijo, tako da spodbudijo sintezo proteinov in zmanjšajo hitrost njihove razgradnje (26). Encimsko /imunohistokemična karakterizacija mišičnih vlaken v naši raziskavi ni potrdila vpliva kratkotrajne androgene deprivacije z imunokastracijo na deleže posameznih tipov vlaken, medtem ko smo ugotovili, da kirurška kastracija (dolgotrajna androgena deprivacija) vpliva na zmanjšan delež oksidativnih vlaken (tip IIa in SDH++) v LD v primerjavi z EM.

Encimskoimunohistokemična razvrstitev vlaken se večinoma sklada z izražanjem izoform MyHC na ravni mRNA. Tudi drugi avtorji poročajo o povezavi med izražanjem prepisa za izoforme MyHC in ravnjo proteinov v mišici oz. deležem posameznega tipa vlaken (22, 40, 53). Z analizo qPCR pa nismo zaznali razlik v izražanju MyHC IIa med EM in SC, kljub razliki v deležu vlaken IIa. Pri prašičih se Mab SC 71 veže na obe izoformi MyHC IIa in IIx, vendar z različnimi afinitetami (43). Predvideva se tudi, da je navzkrižna reaktivnost SC 71 z MyHC IIx posledica prisotnosti hibridnih vlaken, ki izražajo IIa in IIx (54). To lahko razloži težave pri

ustrezni razvrstitevi podskupine vlaken, ki izražajo obe izoformi MyHC, tj. IIa in IIx v različnih razmerjih.

Večina študij o vplivu spola na histokemični profil mišičnih vlaken pri prašičih je vključevala primerjavo svinj (samic) in kirurških kastratov (zgodnja kastracija). Na splošno imajo svinje v primerjavi s kastrati večja vlakna, brez razlik v deležih vlaken in relativnih površinah. V LD so ugotovili večjo relativno površino vlaken tipa I pri merjascih v primerjavi s svinjami, na podlagi česar so sklepali o vplivu kirurške kastracije merjaščkov na relativno površino vlaken tipa I (55). Tudi naši rezultati potrjujejo vpliv kirurške kastracije (dolgotrajne androgene deprivacije) na delež oksidativnih vlaken v LD. V nasprotju s kirurško kastracijo pa je bil vpliv kratkotrajne androgene deprivacije z imunokastracijo značilen samo v mišici s prevladujočim deležem oksidativnih vlaken, medtem ko vpliv v LD ni dosegel statistične značilnosti. Pri IC sta bila značilno zmanjšana CSA vlaken tipa I v primerjavi z EM in SC in relativna površina vlaken tipa I, relativna površina vlaken IIa pa je bila v primerjavi z EM povečana. V eni od redkih prehodnih študij o vplivu imunokastracije na histomorfometrični profil mišičnih vlaken v LD poročajo o nižjem deležu vlaken IIb v primerjavi s SC in težnji k povečani relativni površini vlaken IIa (56). Podobna težnja je razvidna tudi iz naših rezultatov za LD. Vpliv kratkotrajne androgene deprivacije na površino prečnega preseka (CSA) oksidativnih vlaken tipa I, ne pa tudi na kontraktilni fenotip (deleže vlaken), je primerljiv s študijami pri ljudeh in podatki, pridobljenimi pri miših z izbitim receptorjem za androgene (AR) (57, 58). Na splošno velja, da imajo vsa vlakna pri moških bistveno večji CSA v primerjavi z ženskami, kar je sorazmerno z razlikami v masi med spoloma. Pomanjkanje testosterona vodi v upad telesne mase, zmanjšanje premera vlaken in preobrazbo v počasi krčljiva vlakna. Testosteron deluje prek AR, ker pa aromataza pretvori testosteron v estrogene, se lahko učinki testosterona izražajo tudi prek receptorjev za estrogen (ER), vpliv na kontrakcijo pa naj bi potekal z aktivacijo ER. Satelitske celice so prevladujoče mesto izražanja AR (59) in testosteron spodbuja hipertrofijo mišičnih vlaken s povečanjem števila satelitskih celic. Populacija satelitskih celic je večja v vlaknih z visokim oksidativnim potencialom kot v tistih z nizkim (26), zato se vpliv kratkotrajne androgene deprivacije kaže v zmanjšanju CSA vlaken tipa I.

Vpliv na izražanje genov, povezanih s presnovnim fenotipom oz. kakovostjo mesa ali sposobnostjo indukcije preobrazbe skeletnomišičnih vlaken (PGC-1 α , PPAR γ , LPL, HK2 in Gα13), je manjši, kot smo predvidevali. Pomanjkanje testosterona je povezano z zmanjšanim izražanjem HK2, pri čemer se predvideva pozitivni vpliv testosterona prek AR na izražanje

HK2 (34). Gostota AR je večja pri satelitskih celicah (26), le-teh pa je več v vlaknih z visokim oksidativnim potencialom, kar lahko razloži tako višjo raven izražanja HK2 v SSC kot LD, kakor tudi znižano raven izražanja HK2 v SSC pri SC.

V SSC ugotavljamo tudi višjo raven izražanja mRNA za encim, vključen v lipidno presnovo (LPL), pri EM v primerjavi s SC, kar je skladno z višjo aktivnostjo LPL v mišicah s prevladujočo oksidativno presnovo (60). PGC-1 α učinkuje na številne ciljne gene, ki so pomembni za oksidativno presnovo, biogenezo/funkcijo mitohondrijev, preobrazbo hitro krčljivih glikolitičnih vlaken v počasi krčljiva oksidativna vlakna in diferenciacijo mioblastov (31-33). Če upoštevamo večji delež oksidativnih vlaken pri EM v primerjavi s SC v LD, bi pričakovali višjo raven PGC-1 α in genov, vključenih v lipidno presnovo (PPAR γ in LPL), vendar naši rezultati tega ne potrjujejo. Te rezultate bi bilo mogoče razlagati z nekateri drugimi objavami, ki poročajo o: i) odsotnosti korelacije med ravnjo PGC-1 α in mišično oksidacijsko zmogljivostjo (aktivnostjo SDH) pri človeških vlaknih (61), ii) prevladujoči posttranslacijski regulaciji aktivnosti PGC-1 α (62) ter iii) starostnih razlikah v izražanju PGC-1 α med divjimi in konvencionalno rejenimi domačimi prašiči, saj je raven PGC-1 α povečana le v zgodnjem postnatalnem obdobju in ne pri odraslih divjih prašičih z višjim deležem oksidativnih vlaken v LD (22). Vloga Gα13 v skeletni mišičnini je še zelo slabo raziskana. Izbitje Gα13 v skeletni mišičnini povzroči, da skeletne mišice pridobijo oksidativni fenotip in povečajo presnovo maščobnih kislin (36). Razlik v izražanju Gα13 med proučevanima mišicama ali vpliva spolne kategorije nismo ugotovili. Vendar kljub temu v obeh mišicah ugotavljamo pozitivne korelacije med Gα13 in geni, vključenimi v lipidni metabolizem (PGC-1 α PPAR γ in LPL).

Če povzamemo, so rezultati potrdili značilen vpliv imunokastracije na relativno površino oksidativnih vlaken tipa I in IIa, ki prevladujejo v SSC. Vpliv dolgotrajne androgene deprivacije (kiruška kastracija) se kažejo v povečanem deležu oksidativnih SDH++ pozitivnih vlaken v LD in znižanem izražanju HK2 v SSC vprimerjavi z IC.

6 ZAKLJUČKI

Zaključki naloge so:

1. Vzorec izražanja MyHC je primerljiv med proučevanimi spolnimi kategorijami.
2. Kratkotrajna androgena deprivacija z imukastracijo zmanjša potencial oksidativnih vlaken tipa I za hipertrofijo, tj. zmanjša njihovo površino v SSC.
3. Dolgotrajna androgena deprivacija zmanjša delež vlaken z visokim oksidativnim potencialom v LD.
4. Izražanje dveh presnovnih encimov (HK2 in LPL) je odvisno od dolžine androgena deprivacije. Zaključki 1 do 4 delno potrjujejo prvo hipotezo, in sicer da so presnovne in morfometrične lastnosti skeletnomišičnih vlaken odvisne od dolžine androgena deprivacije, medtem ko značilnega vpliva na vzorec izražanja MyHC nismo potrdili.
5. Vpliva androgena deprivacije na izražanje genov, ki lahko spodbudijo preobrazbo glikolitičnih vlaken v oksidativna vlakna, nismo potrdili. S tem smo ovrgli drugo hipotezo, ki je predvidevala, da je preobrazba skeletnomišičnih vlaken povezana z razlikami v izražanju PGC-1 α in Gα13.

7 ZAHVALA

Ob tej priložnosti se iskreno iz srca zahvaljujem svoji mentorici prof. dr. Milki Vrecl Fazarinc, ki me je ves čas izdelave naloge spodbujala ter stala ob strani. Najlepša hvala za prejeto znanje, izkušnje, usmerjanje pri delu ter pomoč pri izdelavi naloge. Iskreno se zahvaljujem tudi somentrotici pri raziskovalni nalogi prof. dr Marjeti Čandek-Potokar za pomoč pri iskanju literature, usmerjanju pri delu ter vrednotenju in razlagi rezultatov. Posebna zahvala tudi prof. dr. Gregorju Fazarincu za dragocene napotke in pomoč pri imuhistokemični razvrstitvi mišičnih vlaken.

Zahvaljujem se tudi preostalim zaposlenimi na Inštitutu za predklinične vede Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani na Enoti za anatomijo, histologijo, embriologijo in citologijo ter Enoti za farmakologijo in toksikologijo. Ga. Magdaleni Dobravec, ga. Jasni Šporar ter ga. Katarini Babnik za pomoč pri laboratorijskem delu.

Prav tako najlepša hvala vsem preostalim zaposlenim na Kmetijskem Inštitutu Slovenije, Oddelka za živinorejo, predvsem dr. Martinu Škrlepu in Klavdiji Poklukar.

Najlepša hvala mag. Brigit Grecs-Smole za pregled literature in lektorici Nini Novak Kerbler za pregled slovenskega besedila.

8 VIRI IN LITERATURA

1. Bonneau M, Chevillon P. Acceptability of entire male pork with various levels of androstenone and skatole by consumers according to their sensitivity to androstenone. *Meat Sci* 2012; 90: 330–7. doi: 10.1016/j.meatsci.2011.07.019.
2. Mainau E, Temple D, Manteca X. Effect of castration on the welfare of pigs. In: Fact sheet The Farm Animal Welfare Education center. Barcelona: FAWEC, 2013: 2 str. <https://www.fawec.org/en/fact-sheets/36-swine/113-effect-of-castration-on-the-welfare-of-pigs> (12. jul. 2020).
3. Shi X, Li C, Cao M, Xu X, Zhou G, Xiong YL. Comparative proteomic analysis of longissimus dorsi muscle in immuno- and surgically castrated male pigs. *Food Chem* 2016; 199: 885–92. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.11.059.
4. Prunier A, Bonneau M, Von-Borell EH, et al. A review of the welfare consequences of surgical castration in piglets and the evaluation of non-surgical methods. *Anim Welf* 2006; 15: 277–89.
5. Backus G, Higuera M, Juul N, Nalon E, de Briyne N. Second progress report 2015–2017 on the European declaration on alternatives to surgical castration of pigs. Brussels: Expert Group of European Commission, 2018. <https://www.boarsontheway.com/wp-content/uploads/2018/08/Second-progress-report-2015-2017-final-1.pdf> (12. jul. 2020)
6. Castrum consortium. Methods of anaesthesia and analgesia for all pigs and other alternatives for pigs used in traditional products. Publications Office of the EU. Brussels: European Comission, 2016. <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/5fe8db00-dbb8-11e6-ad7c-01aa75ed71a1> (12. 7. 2020).
7. Čandek-Potokar M, Skrlep M, Zamaratskaia G. Immunocastration as alternative to surgical castration in pigs. [online] In: Payan-Carriera R, ed. *Theriogenology*. London: IntechOpen, 2017: e1282. doi: 10.5772/intechopen.68650.

8. Batorek Lukač N, Škrlep M, Tomažin U. Alternative kastraciji pujskov pri pitanju na višjo težo. [online] - Ljubljana : Kmetijski inštitut Slovenije, 2015. 1–8.
9. Pauly C, Spring P, O'Doherty JV, et al. Growth performance, carcass characteristics and meat quality of group-penned surgically castrated, immunocastrated (Improvac®) and entire male pigs and individually penned entire male pigs. *Animal* 2009; 3(7): 1057–66. doi: 10.1017/S1751731109004418.
10. Bonneau M, Čandek-Potokar M, Škrlep M, Font IFM, Aluwé M, Fontanesi L. Potential sensitivity of pork production situations aiming at high-quality products to the use of entire male pigs as an alternative to surgical castrates. *Animal* 2018; 12: 1287–95. doi: 10.1017/S1751731117003044.
11. Martinez-Macipe M, Rodríguez P, Izquierdo M, et al. Comparison of meat quality parameters in surgical castrated versus vaccinated against gonadotrophin-releasing factor male and female Iberian pigs reared in free-ranging conditions. *Meat Sci* 2016; 111: 116–21. doi: 10.1016/j.meatsci.2015.09.002.
12. Brewster V, Nevel A. Immunocastration with Improvac™ reduces aggressive and sexual behaviours in male pigs. *Appl Anim Behav Sci* 2013; 145: 32–6. doi.org/10.1016/j.applanim.2013.01.012.
13. Škrlep M, Šegula B, Prevolnik M, Kirbiš A, Fazarinc G, Čandek-Potokar M. Effect of immunocastration (Improvac) in fattening pigs. *Slov Vet Res* 2010; 47: 65–2.
14. Fazarinc G. Anatomija domačih sesalcev. Miologija: skripta za študente veterinarstva. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 2009: 1–92.
15. Fazarinc G. Histrokemični profil ventralne nazobčane (*M. Serratus ventralis*) in najdaljše hrbtne mišice (*M. Longissimus dorsi*) pri križancih pitovnih prašičev. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, 1994. Doktorska disertacija.

16. Štrbenc M. Preobrazba težkih miozinskih verig v skeletnih mišičnih vlaknih psa med postnatalnim razvojem. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, 2003. Doktorska disertacija.
17. Schiaffino S, Saggin L, Viel A, Ausoni S, Sartore S, Gorza L. Muscle fiber types identified by monoclonal antibodies to myosin heavy chains. In: Benzi GLP, Siliprandi N, eds. Biochemical aspects of physical exercise. Amsterdam: Elsevier, 1996: 27–34.
18. Listrat A, Lebret B, Louveau I, et al. How muscle structure and composition influence meat and flesh quality. *ScientificWorldJournal* 2016; 2016: e3182746. doi: 10.1155/2016/3182746.
19. Weiss A, McDonough D, Wertman B, et al. Organization of human and mouse skeletal myosin heavy chain gene clusters is highly conserved. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 2959–63. doi: 10.1073/pnas.96.6.2958.
20. Campbell NJ, Maani CV. Histology, muscle. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2020.
21. Lefaucheur L. Myofiber typing and pig meat production. *Slov Vet Res* 2001; 38: 5–28.
22. Vrecl M, Cotman M, Uršič M, Čandek-Potokar M, Fazarinc G. Age-dependent expression of MyHC isoforms and lipid metabolism-related genes in the longissimus dorsi muscle of wild and domestic pigs. *Animals (Basel)* 2018; 9: e10. doi: 10.3390/ani9010010.
23. Jones J, Round J. Skeletal muscle in healthy and disease. Manchester: University Press, 1990: 89–97.
24. Hughes S, Cho M, Karsch-Mizrachi I. Three slow myosin heavy chains sequentially expressed in developing mammalian skeletal muscle. *Dev Biol* 1993; 158: 183–99. doi: 10.1006/dbio.1993.1178.

25. Bhushan S, Taylor WE, Singh R, Artaza J, Sinha-Hikim I, Jasuja R, et al. The Mechanisms of Androgen Effects on Body Composition: Mesenchymal Pluripotent Cell as the Target of Androgen Action.

J Gerontol A Biol Sci Med Sci 2003; 58:M1103-10. doi: 10.1093/gerona/58.12.m1103.

26. van Wessel T, de Haan A, van der Laarse WJ, Jaspers RT. The muscle fiber type-fiber size paradox: hypertrophy or oxidative metabolism? Eur J Appl Physiol 2010; 110(4): 665–94. doi: 10.1007/s00421-010-1545-0.

27. Trefan L, Doeschl-Wilson A, Rooke J, Terlouw C, Bünger L. Meta-analysis of effects of gender in combination with carcass weight and breed on pork quality.

J Anim Sci 2013; 91: 1480–92. doi: 10.2527/jas.2012-5200.

28. Škrlep M, Poklukar K, Kress K, et al. Effect of immunocastration and housing conditions on pig carcass and meat quality traits.

Transl Anim Sci 2020; 4: e 1-14. doi: 10.1093/tas/txaa055.

29. Batorek N, Čandek-Potokar M, Bonneau M, Van Milgen J. Meta-analysis of the effect of immunocastration on production performance, reproductive organs and boar taint compounds in pigs. Animal 2012; 6: 1330–8. doi: 10.1017/S1751731112000146.

30. Batorek N, Skrlep M, Prunier A, et al. Effect of feed restriction on hormones, performance, carcass traits, and meat quality in immunocastrated pigs.

J Anim Sci 2012; 90: 4593–603. doi: 10.2527/jas.2012-5330.

31. Erkens T, Van Poucke M, Vandesompele J, Goossens K, Van Zevenen A, Peelman LJ. Development of a new set of reference genes for normalization of real-time RT-PCR data of porcine backfat and longissimus dorsi muscle, and evaluation with PPARGC1A.

BMC Biotechnol 2006; 6: e41. doi: 10.1186/1472-6750-6-41.

32. Lin J, Wu H, Tarr PT, et al. Transcriptional co-activator PGC-1 α drives the formation of slow-twitch muscle fibres. Nature 2002; 418: 797–801. doi: 10.1038/nature00904.

33. Lin Y, Zhao Y, Li R, Gong J, Zheng Y, Wang Y. PGC-1 α is associated with C2C12 myoblast differentiation.
Cent Eur J Biol 2014; 9: 1030–6. doi: 10.2478/s11535-014-0341-y.
34. Kelly DM, Akhtar S, Sellers DJ, Muraleedharan V, Channer KS, Jones TH. Testosterone differentially regulates targets of lipid and glucose metabolism in liver, muscle and adipose tissues of the testicular feminised mouse.
Endocrine 2016; 54: 504–15. doi: 10.1007/s12020-016-1019-1.
35. Wang J, Deng C-y, Xiong Y-z, et al. Sequencing, polymorphism and expression profile analysis of porcine hexokinase II (HK2) gene.
Agri Sci China. 2006; 5: 384–9. doi: 10.1016/S1671-2927(06)60065-5
36. Koo JH, Kim TH, Park SY, et al. G α 13 ablation reprograms myofibers to oxidative phenotype and enhances whole-body metabolism.
J Clin Investi 2017; 127: 3845–60. doi: 10.1172/JCI92067.
37. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. Off J Eur Union 2010; 53 (L276): 33–79.
38. Kress K, Weiler U, Schmucker S, et al. Influence of housing conditions on reliability of immunocastration and consequences for growth performance of male pigs.
Animals (Basel) 2019; 10: e27. doi: 10.3390/ani10010027.
39. Kress K, Verhaagh M. The economic impact of herman pig carcass pricing systems and risk scenarios for boar taint on the profitability of pork production with immunocastrates and boars. Agriculture 2019; 9: e204. doi:10.3390/agriculture9090204
40. Fazarinc G, Vrecl M, Skorjanc D, Cehovin T, Candek-Potokar M. Dynamics of myosin heavy chain isoform transition in the longissimus muscle of domestic and wild pigs during growth: a comparative study. Animal 2017; 11: 164–74. doi: 10.1017/S1751731116001312.

41. Nachlas MM, Tsou KC, de Souza E, Cheng CS, Seligman AM. Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of a new p-nitrophenyl substituted ditetrazole. *J Histochem Cytochem* 1957; 5: 420–36. doi: 10.1177/5.4.420.
42. 40. Schiaffino S, Gorza L, Sartore S, *et al.* Three myosin heavy chain isoforms in type 2 skeletal muscle fibres. *J Muscle Res Cell Motil* 1989; 10: 197–205. doi.org/10.1007/BF01739810
43. Lefaucheur L, Ecolan P, Plantard L, Gueguen N. New insights into muscle fiber types in the pig. *J Histochem Cytochem*: 2002; 50: 719–30. doi: 10.1177/002215540205000513.
44. Wimmers K, Ngu NT, Jennen DG, et al. Relationship between myosin heavy chain isoform expression and muscling in several diverse pig breeds. *J Anim Sci* 2008; 86: 795–803. doi: 10.2527/jas.2006-521.
45. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. *Methods* 2001; 25: 402–8. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
46. R Core Team. R: a language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2013.
47. Pauly C, Luginbühl W, Ampuero S, Bee G. Expected effects on carcass and pork quality when surgical castration is omitted--results of a meta-analysis study. *Meat Sci.* 2012;92: 858-62. doi: 10.1016/j.meatsci.2012.06.007.
48. Karlsson AH, Klont RE, Fernandez X. Skeletal muscle fibres as factors for pork quality. *Livest. Prod. Sci* 1999; 60: 255–69. doi: 10.1016/S0301-6226(99)00098-6.
49. Lefaucheur L. A second look into fibre typing-relation to meat quality. *Meat Sci* 2010; 84: 257–70. doi: 10.1016/j.meatsci.2009.05.004.

50. Lefaucheur L, Le Dividich J, Mourot J, Monin G, Ecolan P, Krauss D. Influence of environmental temperature on growth, muscle and adipose tissue metabolism, and meat quality in swine. *J Anim Sci* 1991; 69: 2844–54. doi: 10.2527/1991.6972844x.
51. Fiedler I, Ender K, Wicke M, Maak S, Lengerken GV, Meyer W. Structural and functional characteristics of muscle fibres in pigs with different malignant hyperthermia susceptibility (MHS) and different meat quality. *Meat Sci* 1999; 53: 9–15. doi: 10.1016/S0309-1740(99)00030-3.
52. Fernandez X, Lefaucheur L, Candek M. Comparative study of two classifications of muscle fibres: Consequences for the photometric determination of glycogen according to fibre type in red and white muscle of the pig. *Meat Sci* 1995; 41: 225–35. doi: 10.1016/0309-1740(94)00059-g.
53. Men XM, Deng B, Tao X, Qi KK, Xu ZW. Association analysis of myosin heavy-chain genes mRNA transcription with the corresponding proteins expression of longissimus muscle in growing pigs. *Asian-Australas J Anim Sci* 2016; 29: 457–63. doi: 10.5713/ajas.15.0259.
54. Toniolo L, Patruno M, Maccatrazzo L, et al. Fast fibres in a large animal: fibre types, contractile properties and myosin expression in pig skeletal muscles. *J Exp Biol* 2004; 207: 1875–86. doi: 10.1242/jeb.00950.
55. Lefaucheur L, Gerrard D. Muscle fiber plasticity in farm mammals. *J Anim Sci* 2000; 77(Suppl. E): e1-19. doi: 10.2527/jas2000.77E-Suppl1b.
56. Li H, Gariépy C, Jin Y, et al. Effects of ractopamine administration and castration method on muscle fiber characteristics and sensory quality of the longissimus muscle in two Piétrain pig genotypes. *Meat Sci* 2015; 102: 27–34. doi: 10.1016/j.meatsci.2014.10.027.
57. Haizlip KM, Harrison BC, Leinwand LA. Sex-based differences in skeletal muscle kinetics and fiber-type composition. *Physiology (Bethesda)* 2015; 30: 30–9. doi: 10.1152/physiol.00024.2014.

58. MacLean HE, Chiu WS, Notini AJ, *et al.* Impaired skeletal muscle development and function in male, but not female, genomic androgen receptor knockout mice. *FASEB J* 2008; 22: 2676–89. doi: 10.1096/fj.08-105726.
59. Sinha-Hikim I, Taylor WE, Gonzalez-Cadavid NF, Zheng W, Bhushan S. Androgen receptor in human skeletal muscle and cultured muscle satellite cells: up-regulation by androgen treatment. *J Clin Endocrinol Metabol* 2004; 89: 5245–55. doi: 10.1210/jc.2004-0084.
60. Poklukar K, Čandek-Potokar M, Batorek Lukač N, Tomažin U, Škrlep M. Lipid deposition and metabolism in local and modern pig breeds: a review. *Anim* 2020; 10: 424. doi: 10.3390/ani10030424.
61. Gouspillou G, Sgarioto N, Norris B, et al. The relationship between muscle fiber type-specific PGC-1 α content and mitochondrial content varies between rodent models and humans. *PloS One* 2014; 9: e103044. doi: 10.1371/journal.pone.0103044.
62. Popov DV. Adaptation of skeletal muscles to contractile activity of varying duration and intensity: the role of PGC-1 α . *Biochem Biokhim* 2018; 83: 613–28. doi: 10.1134/S0006297918060019.